

Organisation und Dynamik der Phospholipide in der Zell- und Akrosommembran von Eberspermien während der Kapazitation und Akrosomreaktion

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Humboldt-Universität zu Berlin

von
Frau Dipl.-Biophys. Anke Kurz
geboren am 16.01.1973 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Herrmann
 2. Prof. Dr. Ingolf Bernhardt
 3. Prof. Dr. Edda Töpfer-Petersen

eingereicht am: 13.10.2004

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2005

Zusammenfassung

Eine wichtige Eigenschaft der Plasmamembran eukaryotischer Zellen, einschließlich derer von Eber- und Forellenspermien, ist eine stabile transversale Asymmetrie der Phospholipide, charakterisiert durch die zytoplasmatische Anreicherung der Aminophospholipide Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin. Diese gilt als wichtige Voraussetzung für die Homöostasis der Zellen und wird energieabhängig durch die Aktivität einer Aminophospholipidtranslokase aufrechterhalten. Die Plasmamembran einiger Säugerzellen weist zudem laterale Lipiddomänen auf, denen eine wesentliche Bedeutung bei der Signaltransduktion zugeschrieben wird. Die transversale und laterale Ungleichverteilung der Membranlipide ist für zahlreiche intra- und interzelluläre Wechselwirkungen von funktioneller Bedeutung.

Säugerspermien stellen hoch spezialisierte Zellen dar, deren Membranen während der Genese intensive Veränderungen durchlaufen. Um die Bedeutung der Phospholipidasymmetrie für die Funktion der Spermien zu untersuchen, wurde die Lokalisation und Dynamik von Phosphatidylserin in der Zell- und Akrosommembran von Eberspermien im Verlauf von Kapazitation und Akrosomreaktion betrachtet. Unter Ausnutzung der selektiven, kalziumabhängigen Bindung von AnnexinV an endogenes Phosphatidylserin konnte dessen Lokalisation an morphologisch differenzierten Zellen verfolgt werden. Eine Markierung der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Phospholipidanaloga lieferte zudem Informationen zur Dynamik der Phospholipide in der Plasmamembran. Die morphologische Differenzierung der Zellen erfolgte entweder am Durchflusszytometer oder fluoreszenz- bzw. elektronenmikroskopisch nach entsprechender Markierung. Propidiumjodid wurde zur Unterscheidung lebender und toter Zellen genutzt, ein selektiv an die äußere Akrosommembran bindendes Lektin (PNA) zur Differenzierung der Membranen im Bereich der Kopfkappe der Spermien.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen sowohl auf eine transversale als auch laterale Ungleichverteilung der Lipide in der Zell- und Akrosommembran während der Genese der Spermien hin. Die Plasmamembran flüssigkonservierter Eberspermien weist eine stabile transversale Phospholipidasymmetrie auf, die u.a. durch eine Anreicherung von Phosphatidylserin im zytoplasmatischen Monolayer charakterisiert ist. Erstmals konnte eine zytoplasmatische Lokalisation von Phosphatidylserin auf der äußeren Akrosommembran nachgewiesen werden. Somit akkumulieren die beiden einander zugewandten zytoplasmatischen Monolayer von Plasmamembran und äußerer Akrosommembran Phosphatidylserin. Auch während der Kapazitation und nach Induktion der Akrosomreaktion mit einem Kalziumionophor exponieren lebende Eberspermien Phosphatidylserin nicht auf

der Zelloberfläche. Die Translokation von NBD-Phosphatidylserin in lebenden, kapazitierten Zellen ist zwar verlangsamt, die transversale Asymmetrie des Phosphatidylserin in der Plasmamembran bleibt jedoch erhalten. Im postakrosomalen Bereich der Eberspermien weist die Plasmamembran eine hohe Stabilität auf. Eine Wechselwirkung des zytoplasmatisch akkumulierten Phosphatidylserin mit Elementen des Zytoskeletts erscheint vor allem in diesem Bereich wahrscheinlich. Mit Hilfe der Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass es kapazitationsbedingt zu einer engen Wechselwirkung zwischen Plasmamembran und äußerer Akrosommembran kommt. Wahrscheinlich ist eine Ausbildung lateraler Membrandomänen in Plasmamembran und äußerer Akrosommembran, in denen Phosphatidylserin zytoplasmatisch akkumuliert, Voraussetzung für diese enge Assoziation, die letztendlich an vielen Orten zur punktuellen Fusion beider Membranen führen kann. Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung lateraler Lipiddomänen in der Plasmamembran von Spermienzellen lieferten die vorrangig methodisch ausgerichteten Arbeiten zur Präparation von sogenannten Raftdomänen in der Plasmamembran von Forellenspermien. Die Isolierung einer Membranfraktion mit erhöhtem Cholesterol/Phospholipid-Verhältnis und charakteristischem Proteinmuster diene unter anderem als Ausgangspunkt für zukünftige Arbeiten an Säugerspermien, wo eine Beteiligung lateraler Lipiddomänen an den Prozessen der Kapazitation und Akrosomreaktion im Hinblick auf die stattfindenden Fusionsprozesse und die Eizellerkennung von besonderem Interesse ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern die Bedeutung der transversalen Phospholipidasymmetrie für die Funktionsfähigkeit der Spermien auch während der Kapazitation und Akrosomreaktion. Die zytoplasmatische Lokalisation von Phosphatidylserin könnte an der Vermittlung der Fusion zwischen Plasmamembran und äußerer Akrosommembran während der Akrosomreaktion beteiligt sein.

Schlagwörter: Spermien, Phospholipide, Plasmamembran, Akrosommembran, Kapazitation, Akrosomreaktion, Durchflusszytometrie, Mikroskopie

Abstract

One of the essential qualities of cell membranes in Eucaryotae, including boar and trout sperm, is a stable transverse phospholipid asymmetry. Cytoplasmatic accumulation of the aminophospholipids, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine characterises this asymmetry and is a major prerequisite for cell homeostasis. It is regulated and maintained by ATP-dependent action of an aminophospholipid translocase. The plasma membranes of several mammalian cells show moreover lateral lipid domains, which are imputed to play a significant role in signal transduction. The transverse and lateral distribution of membrane lipids is of functional importance for numerous intra- and intercellular interactions.

Mammalian spermatozoa are highly specialised cells and their membranes undergo significant changes during genesis. The localisation and dynamics of phosphatidylserine in the cell as well as acrosome membranes of boar sperm cells was studied during capacitation and acrosome reaction to assess the relevance of lipid asymmetry for sperm function. The localisation of endogenous phosphatidylserine in morphologically differentiated cells was followed using the selective calcium depending binding of annexinV. Information on the transverse dynamics of phospholipids in the plasma membrane was obtained by labelling the cells with a NBD-phospholipid analogues. The morphological status of the cells was assessed by flow cytometry, fluorescence and electron microscopy. Propidium iodide was used to discriminate between living and dead cells. PNA, a lectin which binds selectively to the outer acrosome membrane, was applied to distinguish the membranes in the acrosome region of the sperm cell.

The results of this study indicate both a transversal and lateral inhomogenous distribution of lipids in the cell membrane as well as in the outer acrosome membrane during sperm genesis. The plasma membrane of freshly ejaculated, liquid-preserved, boar sperm shows a stable transversal lipid asymmetry characterised among other things by an accumulation of phosphatidylserine in the cytoplasmic monolayer. Moreover a cytoplasmic localisation of phosphatidylserine on the outer acrosome membrane could be detected for the first time. Therefore the two facing cytoplasmic leaflets of the outer acrosome and cell membrane contain phosphatidylserine. Neither during capacitation nor after induction of acrosome reaction with calcium ionophore do living spermatozoa expose phosphatidylserine on their surface. The translocation of NBD-phosphatidylserine in living capacitated cells is certainly slowed down, but its transverse asymmetry in the cell membrane is maintained. Applying fluorescence and electron microscopy substantiated the hypothesis that there are close

interactions between the cell membrane and the outer layer of the acrosome membrane because of capacitation. The cytoplasmic accumulation of phosphatidylserine in lateral lipid domains is probably essential for the strong association of plasma and outer acrosome membrane finally leading to local fusions of both membranes. In the postacrosomal region of the boar sperm cell the plasma membrane shows an excellent structural stability. Especially in this region an interaction between cytoplasmically accumulated phosphatidylserine and proteins and/or cytoskeletal elements may be attributed to its stabilisation.

An indication for the functional meaning of lateral lipid domains in membranes of sperm cells was deduced from the mainly methodical works on preparations of so called “raft domains” in membranes of trout sperm cells. The isolation of a membrane fraction with increased cholesterol to phospholipid ratio and characteristic protein pattern served as a starting point for further investigations on mammalian sperm cells. The involvement of lateral lipid domains in capacitation and acrosome reaction with regard to the occurring fusion processes and the recognition of the oocyte is of particular interest.

The results of the present work substantiate the importance of the transverse phospholipid asymmetry in sperm cell function, during capacitation and acrosome reaction as well. The cytoplasmic localisation of phosphatidylserine could mediate the fusion between cell membrane and outer acrosome membrane during acrosome reaction.

Keywords: sperm, phospholipid, plasma membrane, acrosome membrane, capacitation, acrosome reaction, flowcytometry, microscopy

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Das Spermium und die Entwicklung seiner Befruchtungsfähigkeit	1
1.1.1	Eberspermien	1
1.1.1.1	Morphologie.....	1
1.1.1.2	Reifung im männlichen und weiblichen Genitaltrakt	3
1.1.1.3	Wechselwirkung mit der Eizelle	4
1.1.1.4	Stoffwechselregulation und Motilität.....	5
1.1.1.5	Kapazitation und Akrosomreaktion in vitro.....	7
1.1.2	Forellenspermien.....	8
1.1.2.1	Morphologie.....	8
1.1.2.2	Reifung in männlichen Genitaltrakt und Aktivierung der Motilität	9
1.1.2.3	Wechselwirkung mit der Eizelle	9
1.2	Lipidorganisation in tierischen Membranen	10
1.2.1	Transversale Asymmetrie der Phospholipide	10
1.2.1.1	Charakterisierung der transversalen Phospholipidasymmetrie	10
1.2.1.2	Bewegung von Phospholipiden über die Membran	11
1.2.1.3	Physiologische Relevanz der transversalen Phospholipidasymmetrie.....	13
1.2.2	Lateral inhomogene Verteilung von Membranlipiden.....	15
1.2.2.1	Charakterisierung der lateralen Lipidverteilung	15
1.2.2.2	Physiologische Relevanz lateralen Lipiddomänen	17
1.3	Phospholipide in der Zell- und Akrosommembran von Spermienzellen	19
1.3.1	Zusammensetzung und Organisation der Akrosommembranen	20
1.3.2	Die Zellmembran von Spermienzellen	21
1.3.2.1	Zusammensetzung.....	21
1.3.2.2	Transversale Asymmetrie	23
1.3.2.3	Laterale Ungleichverteilung.....	23

1.4	Membranveränderungen während der Kapazitation und Akrosomreaktion .	24
1.4.1	Entfernung assoziierter Proteine von der Spermienoberfläche	25
1.4.2	Entzug und Umverteilung von Cholesterol	25
1.4.3	Permeabilität der Membran	26
1.4.4	Phosphorylierung und Umverteilung von Membranproteinen.....	26
1.4.5	Lipide – Umverteilung, laterale Diffusion, Packungsdichte, fusogene Lipide	27
1.4.6	Akrosomreaktion	28
1.5	Ziel der Arbeit	29
2	<i>Material und Methoden</i>.....	31
2.1	Chemikalien.....	31
2.2	Lösungen	31
2.3	Eberspermien	32
2.3.1	Kapazitation.....	33
2.3.2	Akrosomreaktion	34
2.3.3	Zona-pellucida-Bindungsassay.....	35
2.3.4	Kavitation	36
2.3.5	Markierungen	37
2.3.5.1	Lebend-Tot-Färbung mit Propidiumjodid	38
2.3.5.2	Färbung der Mitochondrien mit Rhodamin 123 (R123).....	39
2.3.5.3	Bindung von Lektinen an akrosomale Zuckerstrukturen	39
2.3.5.4	AnnexinV-Bindung an endogenes Phosphatidylserin	40
2.3.5.5	Einbau und Translokation von fluoreszenzmarkierten Phospholipidanaloga in die Zellmembran der Spermien	40
2.3.6	Fluoreszenzspektroskopie.....	43
2.3.7	Durchflusszytometrie	44
2.3.8	Mikroskopie.....	45
2.3.8.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	45
2.3.8.2	Elektronenmikroskopie.....	46

2.4	Forellenspermien	47
2.4.1	Isolation von Triton-unlöslichen Membranfraktionen	48
2.4.2	Lipid- und Proteinanalysen	49
2.4.2.1	Lipidextraktion	50
2.4.2.2	Phosphatbestimmung	50
2.4.2.3	Cholesterolbestimmung	50
2.4.2.4	Proteinbestimmung	50
2.5	Berechnungen und Statistik.....	50
3	<i>Ergebnisse</i>	51
3.1	Vorbereitende Versuche zur Markierung von Eberspermien mit Fluoreszenzlabeln.....	51
3.1.1	Lebend-Tot-Färbung mit Propidiumjodid.....	51
3.1.1.1	Optimierung der PI-Färbung für kapazitierte Spermien	52
3.1.2	Einbau NBD-markierter Phospholipide in die Plasmamembran	55
3.1.3	Kombination verschiedener Fluoreszenzmarker.....	59
3.1.3.1	Wechselwirkungen zwischen den Markern	59
3.1.3.2	Farbkompensierung am Durchflusszytometer	61
3.2	Die transversale Lokalisation der Phospholipide in der Plasmamembran von Eberspermien während der Genese - Durchflusszytometrische Analysen.....	62
3.2.1	Transversale Organisation fluoreszenzmarkierter Phospholipidanaloga.....	62
3.2.1.1	Einwärtstranslokation der NBD-Phospholipide.....	62
3.2.1.2	Auswärtstranslokation der NBD-Phospholipide	65
3.2.2	Exposition von endogenem PS: FITC-AnV/PI-Markierung von Eberspermien	66
3.2.2.1	Veränderung der FITC-AnV/PI-Markierung im Verlauf der Inkubation	66
3.2.2.2	Variabilität der FITC-AnV/PI-Markierung kapazitierter Eberspermien.....	68
3.2.2.3	Einflussfaktoren auf die FITC-AnV/PI-Markierung kapazitierter Eberspermien...	69

3.3	Die transversale und laterale Lokalisation von PS in Eberspermien – mikroskopische Untersuchungen zur Zell- und Membranomorphologie.....	73
3.3.1	Transversale Organisation von NBD-PS in kapazitierten Eberspermien.....	73
3.3.2	Lokalisation von endogenem PS in lebenden Eberspermien	74
3.3.3	Lokalisation von endogenem PS in motilen Eberspermien.....	76
3.3.4	Lokalisation von endogenem PS an morphologisch intakte und defekte Eberspermien - Lektinbindung an akrosomale Strukturen	77
3.3.5	Feinstruktur der Zell- und Akrosommembran - Elektronenmikroskopie.....	85
3.3.6	Zona-pellucida-Bindungsassay.....	88
3.4	Untersuchungen zu lateralen Lipiddomänen in Spermienzellen - Präparation Triton-unlöslicher Membranfraktionen.....	91
3.4.1	Charakterisierung der Lysate.....	91
3.4.2	Charakterisierung der Membranbanden nach Ultrazentrifugation	93
4	<i>Diskussion</i>.....	97
	<i>Literaturverzeichnis</i>	123
	<i>Danksagung</i>	137

Abkürzungen

ABC	ATP-bindende Kasette
äAM/iAM	äußere Akrosommembran
AnV	AnnexinV
APLT	Aminophospholipidtranslokase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
BTS	modifizierte Beltsville-Thawing-Solution (Auftaulösung)
cAMP/cGMP	zyklisches Adenosin- (Guanosin) monophosphat
CHO	Cholesterol
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Azetat
FITC	Fluoreszein-5-Isothiozyanat
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HBT	Hank's gepuffertes Tyrodemedium
IFN	Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönau e.V.
M540	Merocyanin 540
NBD	1-acyl-2-[6-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]caproyl]
NAR	normaler akrosomaler Rand
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Propidiumjodid
PIn	Phosphatidylinositol
PKA/PKC	Proteinkinase A / Proteinkinase C
PL	Phospholipid(e)
PM	Plasmamembran
PNA	Peanut Agglutinin
PS	Phosphatidylserin
PSA	Pisum Sativum Agglutinin
R123	Rhodamin 123
RT	Raumtemperatur
SFMM	Seminal fluid mineral medium
SM	Sphingomyelin
SNARE	lösliche N-ethylmaleimide-empfindliche Bindungsprotein Rezeptoren
TALP	modifiziertes Tyrodemedium
TRIS	Tri(hydroxymethyl)aminomethan

1 Einleitung

Das Spermium ist eine hoch spezialisierte Zelle, die der Fortpflanzung dient. Um letztlich die Verschmelzung des genetischen Materials von Spermium und Eizelle zu ermöglichen, muss in der intakten Spermienzelle eine zeitlich und räumlich koordinierte Zellaktivierung stattfinden. Das Spermium muss (1) rechtzeitig zum Ort der Befruchtung gelangen, (2) aktiv die Eizellhüllen durchdringen und schließlich (3) mit der Plasmamembran der reifen Eizelle fusionieren. Ein befruchtungsfähiges Spermium sollte demnach eine stabile Motilität und eine auf die Befruchtung vorbereitete, fusogene Zell- und Akrosommembran aufweisen.

Die Organisation der Phospholipide in der Plasmamembran tierischer Zellen und deren Bedeutung für Homöostasis, Signaltransduktion und Fusion sind seit vielen Jahren Thema intensiver Forschungen und wurde auch an Spermien untersucht. Man geht heute von einer transversalen und lateralen Ungleichverteilung der Phospholipide in der Zellmembran von Spermien aus.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen zur transversalen und lateralen Organisation und Dynamik der Phospholipide in der Zell- und Akrosommembran von Spermien während der Genese. Es soll geklärt werden, ob Änderungen der Phospholipidorganisation in diesen Membranen vorkommen, und inwieweit dies eine Voraussetzung für eine Akrosomreaktion, Wechselwirkungen zwischen den Spermien untereinander und die Zell-Zell-Erkennung an den Eizellhüllen ist.

1.1 Das Spermium und die Entwicklung seiner Befruchtungsfähigkeit

1.1.1 Eberspermien

1.1.1.1 *Morphologie*

Die morphologische Differenzierung von Säugerspermien erfolgt generell in Kopf und Schwanz (Abb. 1). Der Kopf eines Eberspermiums ist ca. 8 μm lang, 4 μm breit und 0,8 μm dick, die Schwanzlänge beträgt ca. 40 μm mit einem Durchmesser von 0,8 (Mittelstück) - 0,1 μm (Endstück).

Der Kopf enthält vor allem den dicht gepackten Zellkern mit einem haploiden Chromosomensatz. Man unterscheidet einen akrosomalen und einen postakrosomalen Kopfabschnitt. Der akrosomale Abschnitt wird durch eine den Zellkern bedeckende Kopfkappe (das Akrosom) gekennzeichnet, die bei intakten Spermien eine apikale Randverdickung (NAR) aufweist. Das Akrosom entsteht während der Differenzierung aus

dem Golgi-Apparat der Spermatiden und enthält, umgeben von den Akrosommembranen, mehrere hydrolytische Enzyme in saurem Milieu. Den dem Zellkern zugewandten Abschnitt bezeichnet man als innere Akrosommembran (iAM), den der Plasmamembran (PM) zugewandten Abschnitt hingegen als äußere Akrosommembran (äAM). Im Äquatorialbereich, am unteren Rand des Akrosoms, gehen die beiden Membranen ineinander über. Den hinteren Teil des Spermienkopfes, auch postakrosomaler Bereich genannt, bildet die Becherhülse. In diesem Bereich wird der Zellkern von Säugerspermien von einer zytoskeletalen Struktur umrandet, die unmittelbar der PM anliegt.

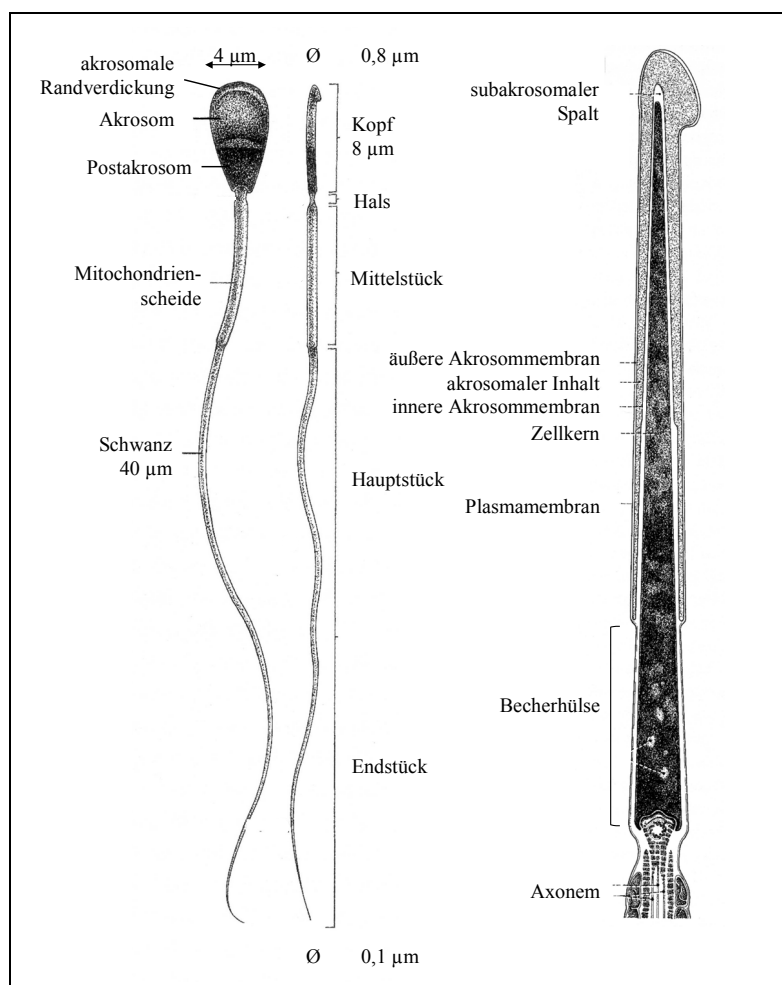


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Säugerspermiums: Angepasst nach [Rüsse and Sinowatz, 1998].

Der bewegliche Schwanz des Spermiums ist eine lange Geißel. Er kann in vier Regionen unterteilt werden: (i) den Hals, der die Verbindung zum Kopf bildet und die Zentriolen enthält, (ii) das Mittelstück, gekennzeichnet durch eine Mitochondrienscheide, (iii) das Haupt- und (iv) das Endstück. Den zentralen Teil der gesamten Geißel bildet das Axonem. Es stellt

den eigentlichen Bewegungsapparat des Spermiums dar. Zusätzlich zum üblichen 9+2-Mikrotubuli-Aufbau wird das Axonem von neun weiteren dichten Fasern, die hauptsächlich aus Keratin bestehen, umgeben. Die Plasmamembran umgibt die gesamte Spermienzelle als Grenze zum umgebenden Milieu.

1.1.1.2 Reifung im männlichen und weiblichen Genitaltrakt

Die männlichen Keimzellen entwickeln sich unter hormoneller Steuerung zunächst im Hoden und erfahren während der Nebenhodenpassage einen intensiven Reifungsprozess [Dacheux et al., 1989]. Als sichtbares Zeichen der Reifung gilt der Erwerb der gerichteten Fortbewegung und der Verlust des Zytoplasmatropfens, der vom oberen Spermischwanz abgestreift wird. Ausgereifte Spermien werden im Nebenhoden bis zur Ejakulation gespeichert und sind prinzipiell in der Lage (i) im männlichen und weiblichen Genitaltrakt zu überleben sowie nach entsprechender Stimulation (ii) die sekundäre Reifung (Kapazitation) zu durchlaufen und (iii) eine reife Eizelle zu befruchten.

Ein Ejakulat setzt sich in der Hauptsache aus Absonderungen des Nebenhodens und verschiedener Geschlechtsdrüsen (Seminalplasma) zusammen und enthält außer den reifen Spermien weitere feste Bestandteile, wie z.B. unreife Samenzellen, Epithelzellen und Leukozyten [Schülke, 1982]. Das Seminalplasma als flüssiger Bestandteil des Ejakulats enthält neben Ionen und Energiesubstraten, die für Homöostasis und Stoffwechsel der Spermien bedeutsam sind, Hormone, Lipide und Proteine. Diese assoziieren z.T. fest an der Spermienoberfläche und bewirken eine allgemeine Stabilisierung der Zelle, schützen die Zellmembran vor Komponenten des weiblichen Genitaltraktes (z.B. Proteasen) und bewirken dort eine Immunsuppression.

Ejakulierte Spermien sind morphologisch völlig ausgereift, jedoch noch nicht sofort in der Lage, eine Eizelle zu befruchten. Erst das Passieren des weiblichen Genitaltraktes versetzt in vivo einen Teil der Spermien in den physiologischen Status eines befruchtungsfähigen Gameten. Durch diesen nachgeschalteten zweiten Reifungsprozess (Kapazitation) kann die Spermienfunktion mit der Ovulation der Eizelle koordiniert werden. Die Passage des weiblichen Genitaltraktes stellt für die überwiegende Mehrzahl aller ejakulierten Spermien ein unüberwindbares Hindernis dar. Sie müssen mechanische Barrieren (Falten, Zilien), physikochemische Barrieren (Zervixschleim) und immunologische Abwehrvorgänge überwinden. Von ca. 10^{10} Spermien eines Ejakulats erreichen ca. 10^4 Zellen den Ort der Speicherung intakter Spermien (Isthmus – der Gebärmutter zugewandte Teil des Eileiters)

und ca. 10^2 Zellen den Ort der Befruchtung (Eileiterampulle) [Töpfer-Petersen and Waberski, 2001]. Der Isthmus bildet somit einerseits ein Spermienreservoir, andererseits finden dort die wesentlichen Schritte der sekundären Reifung statt. Die notwendigen Veränderungen der Spermien nach Ejakulation wurden erstmals 1951 von Austin und Chang [Austin, 1951] beschrieben und werden nach Austin [Austin, 1952] als Kapazitation bezeichnet. Bis heute sind die zugrundeliegenden molekularen Prozesse der Kapazitation noch immer weitgehend unverstanden. Ein deutlich sichtbarer Effekt der Kapazitation ist die Änderung der Bewegungsform (Hyperflagellation) der Spermien. Zahlreiche molekulare Kapazitationseffekte wurden beschrieben, sie betreffen: (i) den Stoffwechsel, z.B. den Anstieg der Respirationsrate; (ii) die intrazellulären Ionenkonzentrationen, z.B. den Anstieg der Kalziumkonzentration und vor allem (iii) zahlreiche Veränderungen der Zellmembran, wie z.B. Fluidität oder Permeabilität. Die kapazitationsbedingten Veränderungen der Zellmembran werden in einem extra Kapitel (1.4, S.24ff) beschrieben.

Die Motilität und Befruchtungsfähigkeit der an die Epithelien des Eileiters gebundenen Spermien bleibt für einige Stunden bis Tage erhalten. Es wird diskutiert, dass die Energieversorgung und Motilität der Spermien über ihre enge Wechselwirkung mit den Epithelzellen reguliert wird. Eventuell kann somit eine frühzeitige Kapazitation unterdrückt werden [Pollard et al., 1991]. Es ist bisher noch nicht klar, ob die Kapazitation der Säugerspermien vor, während oder nach der Eileiterbindung stattfindet. Eine zeitlich und räumlich abgestimmte Befruchtung könnte sowohl durch eine stochastische als auch durch eine induzierte Kapazitation erklärt werden. Einerseits könnte immer eine begrenzte Spermienzahl an den Befruchtungsort entlassen werden, andererseits berichten Hunter et al. von einer induzierten Ablösung vollständig kapazitierter Spermien durch Follikelflüssigkeit (Progesteron) nach Ovulation der Eizelle [Hunter, 1987]. Die Dauer der In-vivo-Kapazitation variiert in Abhängigkeit vom Intervall zwischen Besamung und Ovulation und beträgt i.d.R. einige Stunden.

1.1.1.3 Wechselwirkung mit der Eizelle

Kapazitierte Spermien sind relativ instabil und kurzlebig, so dass der Transport zur Eizelle und die folgende Befruchtung sehr schnell erfolgen müssen [Yanagimachi, 1994]. Der Eileiter transportiert die Spermienzellen und die Eizelle nahezu gleichzeitig aufeinander zu. Die Geschwindigkeit des Spermientransportes hängt neben der Eigenbewegung der Spermien von der Peristaltik des Eileiters, Flüssigkeitsströmen und Zilienaktivität ab. Durch verschiedene

Barrieren wird die Spermienzahl nochmals stark reduziert, so dass Polyspermie in vivo weitestgehend verhindert wird. Der erste Kontakt der Spermien mit der Eizelle findet an den Eizellhüllen (Kumulus, Zona pellucida) statt. Hier erfolgt die artspezifische Erkennung und primäre Bindung der Spermien an die Eizelle, beim Schwein wahrscheinlich an ZPC (ZP3) - ein Zona-pellucida-Protein. Spermadhesine sind spezifische Proteine des Seminalplasmas, die auf der Spermienoberfläche, an Heparin aber auch an die Zona pellucida binden. Sie könnten somit die Wechselwirkung zwischen Spermien und Zona pellucida vermitteln. Glykoproteine der Zona pellucida können des Weiteren die Akrosomreaktion in kapazitierten Spermien auslösen [Bleil and Wassarman, 1983; Töpfer-Petersen, 1989; Benoff, 1997; Hunter, 2003]. An zahlreichen Punkten kommt es zum Verschmelzen von äußerer Akrosommembran und der ihr überlagerten Plasmamembran. Dieser exozytotische Prozess führt zur Freigabe proteolytischer Enzyme des Akrosoms (z.B. Akrosin und Hyaluronidase) an die Spermienoberfläche, welche die Zona pellucida chemisch zersetzen. Dem hyperflagellierenden Spermium wird somit der Durchtritt zur reifen Eizelle ermöglicht [Kopf and Wilde, 1990]. Die Fusion mit der Zellmembran der Eizelle beginnt am Äquatoralsegment von akrosomreagierten Spermien [Bedford, 1969].

1.1.1.4 Stoffwechselregulation und Motilität

Eine zentrale Rolle bei der Regulation von Säugerspermien wird, analog zu anderen Zellen, zyklischen Nukleotiden zugeschrieben [Hoskins and Casillas, 1975]. Sie beeinflussen vor allem in Verbindung mit Kalziumionen entscheidend den Stoffwechsel. Die Hauptkomponenten des Enzymsystems (Adenylatzyklase, Phosphodiesterase) zur Regulation der Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) sowie cAMP-abhängige (PKA) und cAMP-unabhängige (PKC) Proteinkinasen und Proteinphosphatasen, die in Form einer Reaktionskaskade schließlich zur Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Stoffwechselenzymen führen und diese in ihrer Aktivität beeinflussen, sind in Säugerspermien vorhanden.

Die Beteiligung zyklischer Nukleotide (cAMP, cGMP – zyklisches Guanosinmonophosphat) wird sowohl für die Regulation der Spermienmotilität als auch für die Signaltransduktion während der Kapazitation und Akrosomreaktion von Säugerspermien beschrieben. So konnte z.B. an Bullenspermien ein Kalziumeinstrom über zyklische Nukleotid-gesteuerte Kanäle nachgewiesen werden [Wiesner et al., 1998]. Wahrscheinlich dienen sie der rhythmischen Steuerung des Geißelschlages. Eine Chemotaxis, wie sie für Seeigelspermien (Ca^{2+} -, cGMP-

abhängig) schon länger beschrieben wurde, konnte unlängst für Säugerspermien nachgewiesen werden [Garbers, 1989; Spehr et al., 2003]. Dabei kommt es durch Bindung eines Lockstoffes an ein Geruchsrezeptormolekül kalziumabhängig zur Aktivierung einer Adenylatzyklase. Über die Struktur und Lokalisation der Adenylatzyklase (im Zytoplasma gelöst und/oder membrangebunden) in Säugerspermien gibt es bis heute keine eindeutigen Erkenntnisse. Im Gegensatz zu anderen Zellen, erfolgt die Aktivierung der Adenylatzyklase in Spermien, scheinbar nicht über Hormone. Als gesichert gilt, dass eine Stimulierung der Adenylatzyklase während der Kapazitation von Eberspermien direkt durch Bikarbonat (HCO_3^-) erfolgt [Okamura et al., 1985]. Einige Autoren berichten auch über eine direkte Beeinflussung der Adenylatzyklase durch Kalzium und Calmodulin [Gross et al., 1987]. Übliche Hemmstoffe für G-Proteine (Regulation der Adenylatzyklase durch Dissoziation der Untereinheiten) bewirkten in Säugerspermien keine Änderung des intrazellulären cAMP-Gehalts, was auf einen anderen Regulationsmechanismus oder strukturell abweichende G-Proteine in Spermien hinweisen könnte (review: [Harrison, 2003; Visconti et al., 2002]).

Weitere in der Literatur diskutierte Regulationsmechanismen beziehen sich auf die Aktivierung von Phospholipasen, einen Entzug von Cholesterol aus der Plasmamembran, eine Aktivierung von Ionentransportprozessen über die Zellmembran und pH-Verschiebungen durch Veränderungen des extrazellulären Milieus [Langlais and Roberts, 1985; Visconti et al., 2002]. Die während der Kapazitation stattfindenden Membranveränderungen werden im Kapitel 1.4 dargestellt. Bis heute ist die Sequenz der molekularen Regulationsschritte in Säugerspermien nicht geklärt.

Eine kontinuierliche Energiebereitstellung für alle energieverbrauchenden Prozesse (Motilität, Biosynthese, aktiver Transport von Molekülen in der Zelle und über die Zellmembran) erfolgt in tierischen Zellen prinzipiell durch die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) über Glykolyse und Atmung. Eberspermien bauen vorhandene Substrate fast ausschließlich über aerobe Atmung ab. Dabei sind sie in der Lage, selbst bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck eine optimale Atmung sowohl im weiblichen Genitaltrakt als auch unter In-vitro-Bedingungen aufrecht zu erhalten. Sowohl zelleigene als auch extrazelluläre Substrate werden abgebaut. Es wird angenommen, dass bei Säugerspermien vorwiegend Fettsäuren aus den Plasmalogenen als endogene Energielieferanten dienen [Scott, 1973]. Diese werden durch Phospholipasen freigesetzt und über die β -Oxidation und den Zitratzyklus abgebaut. Als extrazelluläre Substrate kommen glykosylierbare Zucker sowie verschiedene Fett- und Aminosäuren in Frage, die in den Sekreten des männlichen und weiblichen Genitaltraktes

vorkommen. Unter aeroben Bedingungen stellt bei Eberspermien fast ausschließlich die in der inneren Mitochondrienmembran gelegene Atmungskette die notwendige Energie bereit. Die Mitochondrien der Spermien haben gegenüber anderen Zellen die Besonderheit, Laktat über ein Isoenzym der Laktatdehydrogenase intramitochondrial zu Pyruvat zu dehydrieren. Eberspermien sind nur in Gegenwart von Sauerstoff motil und verfügen wahrscheinlich über eine besonders schnelle Laktatoxidation. Das ausschließlich in den Mitochondrien synthetisierte ATP muss zu den distal gelegenen Verbrauchsorten transportiert werden [Schülke, 1982].

1.1.1.5 Kapazitation und Akrosomreaktion in vitro

Die meisten Untersuchungen an Säugerspermien werden in-vitro durchgeführt. Dabei simulieren die verwendeten Kapazitationsmedien die Ionenzusammensetzung, Osmolarität und den pH-Wert der Eileiterflüssigkeit im weiblichen Genitale. Zur Stabilisierung des pH-Wertes wird ein Puffersystem (z.B. HEPES) eingesetzt. Der Zusatz von Substraten für den Energiestoffwechsel (Laktat, Glukose, Pyruvat) sichert die Homöostasis und Motilität der Spermien über einen längeren Inkubationszeitraum. Kapazitationsmedien enthalten immer Bikarbonat (10-25 mM), meist einen Cholesterolakzeptor (z.B. Rinderserumalbumin - BSA: 1-5 mg/ml), und i.d.R. Kalzium (2-3 mM). BSA erhält scheinbar über Wechselwirkungen mit Membranproteinen die Stabilität und Motilität der Spermienzelle während der Kapazitation [Davis et al., 1979]. Die Inkubationsbedingungen variieren z.T. beträchtlich. Eberspermien werden bei 37-39°C für 30 min bis 8 h bei einer Zellkonzentration zwischen 10^6 - 10^9 Spermien/ml mit oder ohne Heparin kapazitiert. Die Inkubation erfolgt häufig im Zellkulturschrank (5% CO₂). Die molekularen Prozesse der Kapazitation gelten prinzipiell als reversibel [Yanagimachi, 1994]. Mit zunehmender Inkubationsdauer in kalziumhaltigem Medium steigt jedoch der Anteil der Spermien, bei denen spontan die Akrosomreaktion abläuft, an. Morphologisch entsprechen die entstehenden Vesikel denen einer In-vivo-Akrosomreaktion [Watson et al., 1992]. Viele Autoren definieren die vorzeitige Akrosomreaktion jedoch als Artefakt der In-vitro-Kapazitation und Zeichen des Absterbens [Yanagimachi, 1994].

Zur Auslösung der Akrosomreaktion in vitro wird bei Eberspermien entweder ein Kalziumionophor (A-23187; 1-10 µM; [Yanagimachi, 1994]) oder Lysophosphatidylcholin (100-250 µM [Fazeli et al., 1999; Maxwell and Johnson, 1997]) verwendet. Es ist weiterhin möglich, verschiedene Effektoren des weiblichen Genitales (z.B. Progesteron, Zona pellucida,

Kumuluszellen) einzusetzen. Die Anwesenheit von extrazellulärem Kalzium ist für das Auslösen der Akrosomreaktion unabdingbar, während die Kapazitation von Eberspermien zumindest teilweise auch in kalziumfreiem Medium abläuft.

1.1.2 Forellenspermien

1.1.2.1 Morphologie

Auch Forellenspermien sind generell in Kopf und Schwanz differenziert (Abb. 2). Der Kopf des reifen Spermiums ist ca. 2,5 μm lang und 1,5 μm breit, die Schwanzlänge beträgt 35 μm .

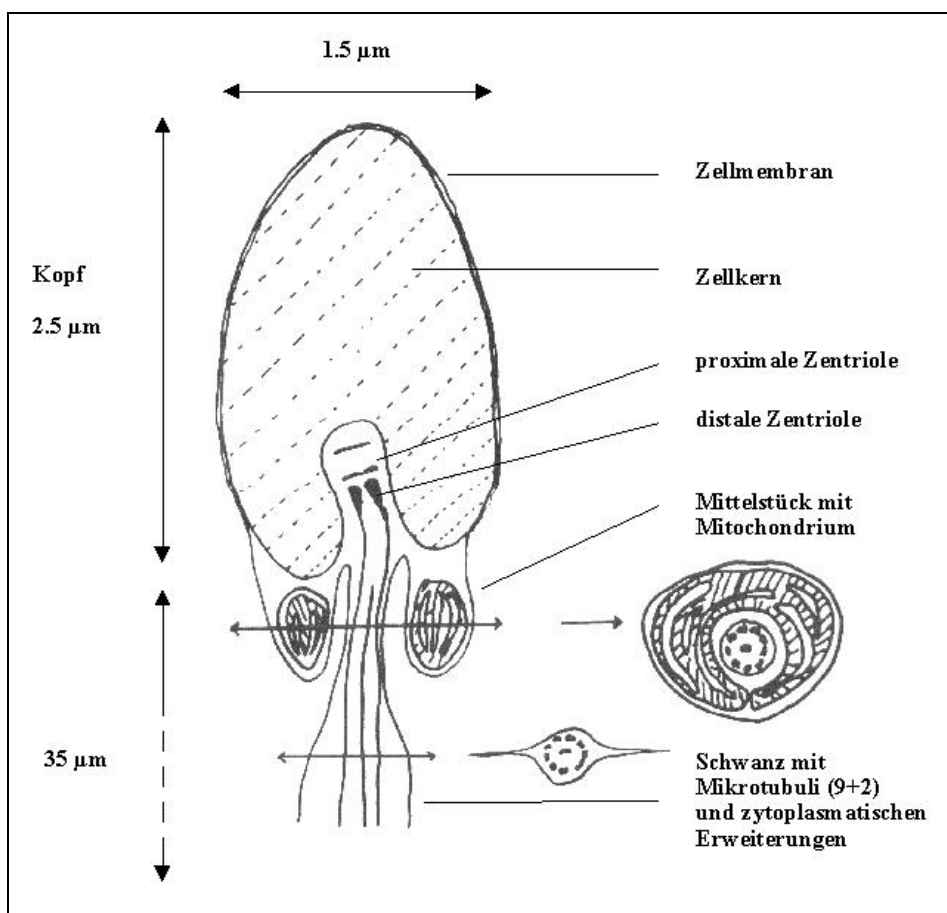


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Forellenspermiums nach [Billard, 1983].

Der Zellkern füllt nahezu den gesamten Kopf des Spermiums aus. Das in der Genese zunächst noch vorhandene Akrosom wird vollständig zurückgebildet. Im Mittelstück befindet sich ein einzelnes ringförmiges, nicht geschlossenes Mitochondrium. Durch eine Einschnürung der Zellmembran ist das Mittelstück deutlich von Schwanz abgegrenzt. Der Schwanz zeigt zwei laterale zytoplasmatische Erweiterungen mit Vesikeln im Inneren.

1.1.2.2 Reifung im männlichen Genitaltrakt und Aktivierung der Motilität

Die Genese der Forellenspermien ist ein saisonaler Prozess, der in der Zeit von März bis Mai beginnt [Scott and Sumpter, 1989]. Die Regulation erfolgt hormonell und führt im Sommer und Herbst zu einem starken Wachstum der Gonaden. Im September/Okttober werden die vollständig ausgereiften Spermatozoiden in das Lumen der Samenstränge abgegeben. Während der Passage der Samenstränge sind die Zellen vom Seminalplasma und Sekreten der Samenstränge umgeben [Billard, 1979]. Sie werden bis zur Ejakulation in der Laichzeit mehrere Wochen gespeichert. Die Motilität der Spermien wird erst durch die Ejakulation in Wasser und die damit verbundene 100- bis 1000fache Verdünnung der Kaliumkonzentration ausgelöst. Die Verringerung der externen Kaliumkonzentration bewirkt einen Kaliumausstrom und daran gekoppelt einen Kalziumeinstrom in die Zelle [Tanimoto and Morisawa, 1988]. Es kommt zur Umwandlung von ATP in cAMP und zur Proteinphosphorylierung im Spermischwanz [Morisawa and Ishida, 1987]. Einmal aktiviert, zeigen die Forellenspermien eine sehr intensive Bewegung, die nach ca. zwei Minuten wieder erlischt, da der ATP-Gehalt drastisch sinkt. Das Spermium bleibt funktionsfähig und kann seinen ATP-Gehalt regenerieren, ohne dass jedoch die Motilität wiederkehrt [Christen et al., 1987]. Forellenspermien besitzen neben der Fähigkeit zur Glykolyse [Lahnsteiner et al., 1993] einen ausgeprägten oxydativen Stoffwechsel. Der Sauerstoffverbrauch ist auch im immobilen Zustand sehr hoch.

1.1.2.3 Wechselwirkung mit der Eizelle

Die Forellenweibchen legen ihre Eier während der Laichzeit alle auf einmal ab. Jede Eizelle ist von einer Hülle umgeben, die an einer Stelle einen Kanal ausbildet. Diese Mikropyle hat einen Durchmesser, der in etwa dem eines Spermienkopfes entspricht. Während der kurzen Zeit, in der die Spermien nach der Ejakulation motil sind, müssen sie durch die Mikropyle wandern, um die Eizelle zu befruchten [Ginsburg, 1963]. Ähnlich der Befruchtung bei Säugern löst das erste Spermium, das durch diese Pore gelangt ist, nach der Fusion mit der Eizellmembran eine Kaskade aus, die den Durchtritt weiterer Spermien verhindert [Nakano, 1969].

1.2 Lipidorganisation in tierischen Membranen

Die Zellmembran bildet die äußere Grenze tierischer Zellen zum umgebenden Milieu. Sie dient der Aufrechterhaltung der Homöostasis und fungiert als Grenzfläche für Energie-, Stoff- und Informationsaustausch der Zelle mit der Umgebung. Lange Zeit diente das Fluid-Mosaik-Modell [Singer and Nicolson, 1972] als Grundvorstellung der Membranorganisation. Entsprechend diesem Modell bilden die Lipide einen fluiden Bilayer, mit dem zahlreiche Proteine und Kohlenhydrate assoziiert sind. In dieser Lipiddoppelschicht können die einzelnen Lipide sehr schnell lateral diffundieren und sind prinzipiell zufällig und gleichförmig verteilt. In den letzten zwei Jahrzehnten verdichteten sich die Daten, dass die Lipide zahlreicher tierischer Membranen in übergeordneten Domänen organisiert sind und sich sowohl lateral als auch transversal inhomogen über die Membran verteilen (review: [Daleke, 2003; Somerharju et al., 1999]). Die Phospholipide (Phosphatidylcholin – PC, Phosphatidylethanolamin – PE, Phosphatidylserin – PS, Phosphatidylinositol – PI, Sphingomyelin – SM) stellen den größten Anteil der Membranlipide. Weitere wichtige Lipidkomponenten biologischer Membranen sind Glykolipide und Cholesterol (CHO), deren Anteil zwischen verschiedenen Membranen sehr variiert. Generell werden den Membranlipiden neben ihrer strukturbildenden Eigenschaft zahlreiche funktionelle Aufgaben zugeschrieben.

1.2.1 Transversale Asymmetrie der Phospholipide

1.2.1.1 *Charakterisierung der transversalen Phospholipidasymmetrie*

Untersuchungen zur transversalen Asymmetrie von Phospholipiden erfolgen i.d.R. mit Hilfe von fluoreszenz-, spin- oder radioaktivmarkierten Phospholipidanaloga, deren Einbau und Translokation in der Membran verfolgt werden kann [Devaux et al., 2002]. Neuere Arbeiten nutzen die spezifische Bindung fluoreszenzmarkierter Proteine an Phospholipide. So bindet AnnexinV spezifisch an PS, das Peptid Ro09-0198 an PE.

In Analogie zu den folgenden Erläuterungen zur Zell- und Akrosommembran von Spermien werden zunächst die Eigenschaften der homologen Membranen anderer intensiver untersuchter Zellen zusammengefasst. Die Akrosommembranen können, entsprechend ihrer Entstehung, mit einer Membran des Golgi-Apparates verglichen werden.

Man geht heute davon aus, dass die Phospholipide im endoplasmatischen Retikulum über die beiden Monolayer gleich verteilt sind, während die Verteilung der Phospholipide über die tierische Zellmembran eine charakteristische Asymmetrie aufweist. Die Aminophospholipide

PS und PE sind auf der zytoplasmatischen Seite angereichert, die cholinhaltigen Phospholipide (PC und SM) befinden sich hingegen zum überwiegenden Teil im exoplasmatischen Monolayer der Plasmamembran.

Der Golgi-Apparat bildet hinsichtlich der Phospholipidasymmetrie in den Membranen ein wichtiges Entwicklungszentrum. Hier werden zahlreiche Glykolipide und Glykoproteine verändert und sortiert. Auf der dem endoplasmatischen Retikulum zugewandten cis-Seite des Golgi-Apparates befinden sich die Phospholipide wahrscheinlich gleichförmig über den Bilayer verteilt. Mit zunehmender Glykosylierung von Lipiden und Proteinen während des Transportes zur trans-Seite des Golgi-Apparates wird eine Membranasymmetrie aufgebaut. Vom Golgi-Apparat entlassene, sekretorische Vesikel zeigen eine asymmetrische Verteilung der Phospholipide, mit einer Anreicherung von PS und PE auf der zytoplasmatischen Seite [Holthuis et al., 2003].

1.2.1.2 Bewegung von Phospholipiden über die Membran

Die transversale Bewegung der Phospholipide kann allgemein über passive Diffusion (Halbwertszeiten von Stunden), erleichterte Diffusion (proteinabhängig, kein Verbrauch von Stoffwechselenergie) oder aktiven Transport (proteinabhängig, Verbrauch von Stoffwechselenergie) erfolgen [Herrmann et al., 1991].

Erleichterte Diffusion – endoplasmatisches Retikulum/Golgi-Apparat

Die Bewegung der Phospholipide über die Membran des endoplasmatischen Retikulums erfolgt bidirektional, kopfgruppenunabhängig und sehr schnell (Halbwertszeit von einigen Sekunden bis Minuten). Diese schnelle Flip-Flop-Bewegung ist proteinabhängig, benötigt aber keine Stoffwechselenergie [Buton et al., 1996]. Es ist noch unklar, ob ein einzelnes oder verschiedene Proteine diese schnelle transversale Phospholipidbewegung vermitteln. Allein der Einbau kleiner membrandurchspannender Proteinabschnitte (Helices) kann in bestimmten cholesterolarmen Membranen einen schnellen Flip-Flop der Phospholipide bewirken. Die Anreicherung von Cholesterol in den Membranen des Golgi-Apparates (cis → trans) könnte somit das Fehlen einer schnellen bidirektionalen Phospholipidbewegung in sekretorischen Vesikeln und in der Plasmamembran erklären [Kol et al., 2003].

Aktiver, unidirektionaler Transport - ATPasen

Arbeiten der letzten Jahre deuten auf eine Beteiligung bestimmter P-Typ-ATPasen (Drs2p, ATPase II) am Aufbau der transversalen Phospholipidasymmetrie in den Trans-Golgi-Zisternen und in dessen sekretorischen Vesikeln hin (review: [Holthuis et al., 2003]).

In der Plasmamembran transportieren Flippasen abhängig von Adenosintriphosphat (ATP) Phospholipide zur zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran, während Floppasen den zur exoplasmatischen Seite gerichteten ATP-abhängigen Phospholipidtransport vermitteln. Ein aktiver Transport von Aminophospholipiden (PS, PE) wurde erstmals an Erythrozyten nachgewiesen [Seigneuret and Devaux, 1984]. Das dafür verantwortliche Protein wird seitdem als Aminophospholipidtranslokase (APLT) bezeichnet, wurde bis heute jedoch noch nicht identifiziert. Die Aktivität eines solchen Transportproteins wurde weiterhin in der Plasmamembran von Thrombozyten, Lymphozyten, Fibroblasten, Spermien u.a. Zellarten nachgewiesen [Devaux and Zachowski, 1994]. Die APLT transportiert mit Halbwertszeiten von einigen Minuten sowohl PS als auch PE auf die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran, wobei ihre Affinität zu PS etwa 10fach höher ist als zu PE [Zachowski et al., 1986]. Die Aktivität der APLT ist für den Aufbau und den Erhalt einer stabilen Asymmetrie der Phospholipide im Fließgleichgewicht ausreichend, Wechselwirkungen mit Proteinen des Zytoskeletts sind nicht erforderlich, können aber auch nicht ausgeschlossen werden [Heinrich et al., 1997]. Die Transportaktivität der APLT wird durch verschiedene intrazelluläre Effektoren (z.B. $[ATP] \downarrow$, $[Ca^{2+}] \uparrow$) inhibiert. Eine unspezifische, ATP-abhängige Floppase gleicht den Phospholipidtransport der APLT in Erythrozyten aus [Connor et al., 1992].

Aktiver, unidirektionaler Transport - ABC-Transporter

Ursprünglich wegen ihrer Eigenschaften als Antibiotikatransporter untersucht, konnte für einige ABC- (ATP-bindende Kasette) Transporter in den letzten Jahren ein direkter Transport von Lipiden über die Membran (i.d.R. von der zytoplasmatischen zur exoplasmatischen Seite - Floppasen) gezeigt werden. Meist sind die untersuchten ABC-Transporter spezifisch für wenige Substrate. So transportiert z.B. ABCB4 (MDR3) in Hepatozyten hoch spezifisch PC über die Kanalicularmembran ins Lumen. Im Gegensatz dazu zeigt der ABCB1-Transporter (MDR1) eine sehr geringe Substratspezifität und erleichtert den Transport vieler kurzkettiger Phospholipidanaloga über die Membran [van Helvoort et al., 1996]. Dieser Transporter könnte somit die transversale Verteilung der zytoplasmatisch angereicherten endogenen Aminophospholipide beeinflussen. ABCA1 wurde auch mit einer Exposition von PS auf der exoplasmatischen Seite der Plasmamembran apoptotischer Zellen und phagozytierender Makrophagen in Zusammenhang gebracht [Hamon et al., 2000]. Einige ABC-Transporter (A1, B1, G1, 5, 8) scheinen zudem am Cholesterolefflux aus der Membran beteiligt zu sein (review: [Tannert et al., 2003]).

Untersuchungen zum Lipidtransport von ABCA1 deuten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Cholesteroltransport und kalziumabhängigem Phospholipidtransport über die Zellmembran hin. Einerseits bewirkt eine Mutation im ABCA1-Gen einen Defekt des Auswärtstransportes zellulären Cholesterols über die Plasmamembran (Tangier disease, Makrophagen), andererseits zeigen Erythrozyten und Fibroblasten von ABCA1-knockout-Mäusen eine Störung der kalziuminduzierten, transversalen Umverteilung der Phospholipide und damit verbunden eine Exposition von PS [Sims and Wiedmer, 2001].

Erleichterte, kalziumabhängige Diffusion - Scrambling

Als sogenanntes „Scrambling“ wird eine kalziumabhängig, bidirektionalen Bewegung aller Phospholipide über die Plasmamembran bezeichnet. Eine derartige schnelle (Halbwertszeit von einigen Sekunden), von ATP unabhängige Flip-Flop-Bewegung führt in einigen Zellen (z.B. aktivierte Thrombozyten) zu einer Aufhebung bzw. Verminderung der transversalen Phospholipidasymmetrie. Diese wurde durch Exposition von PS auf dem exoplasmatischen Monolayer der Plasmamembran charakterisiert und ist häufig mit der Bildung kleiner Membranvesikel verbunden. Verschiedene molekulare Effekte könnten ein solches Scrambling erklären. So wurde z.B. die kalziumabhängige Inhibierung der APLT, gekoppelt an die Aktivierung eines ABC-Transporters, diskutiert [Bitbol et al., 1987; Hamon et al., 2000]. Weiterhin könnte die direkte Wechselwirkung von freiem Kalzium mit PS deren Verteilung über die Membran beeinflussen. Auch die Ausbildung von Nichtbilayerstrukturen in der Plasmamembran kann in diesem Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden. Viele Autoren gehen heute allerdings von der Aktivierung eines kalziumsensitiven Proteins aus. Aus humanen Erythrozyten konnte unlängst ein Protein (PLSCR1) isoliert und geklont werden, das nach Rekonstitution in Liposomen eine Phospholipid-Scramblase-Aktivität aufwies. PLSCR1 enthält eine C-terminale Transmembrandomäne, eine Proteinkinase C Phosphorylierungsseite sowie Domänen zur Wechselwirkung mit Kalzium und anderen Proteinen (review: [Bever et al., 1999; Sims and Wiedmer, 2001]). In Blutzellen von PLSCR1-knockout-Mäusen konnte allerdings trotzdem ein Scrambling der Phospholipide ausgelöst werden [Zhou et al., 2002].

1.2.1.3 Physiologische Relevanz der transversalen Phospholipidasymmetrie

Die Tatsache, dass eine Zelle auf Kosten ihrer Stoffwechselenergie die transversale Ungleichverteilung der Phospholipide aufrechterhält, wirft die Frage nach der physiologischen Bedeutung dieser Asymmetrie auf. Die folgenden Prozesse lieferten

wiederholt Hinweise dafür, dass die Anordnung der Lipide nicht nur für die Homöostasis einer Zelle wichtig ist, sondern vielmehr eine funktionelle Bedeutung für intra- und interzelluläre Wechselwirkungen hat (review: [Herrmann et al., 1991]).

Zell-Zell-Wechselwirkung

PS exponierende Erythrozyten binden an Makrophagen [Tanaka and Schroit, 1983] und Endothelzellen [Schlegel and Willianson, 1987] und werden selektiv aus der Blutbahn entfernt. Obwohl der Mechanismus dieser Zell-Zell-Wechselwirkung zunächst unklar blieb, gaben diese Beobachtungen Anlass, der Ursache einer solchen Exposition von PS auf dem äußeren Monolayer der Zellmembran nachzugehen. Eine Verminderung der Phospholipidasymmetrie wurde z.B. bei gealterten Erythrozyten [Connor et al., 1994], bei Thrombozyten nach Stimulation der Gerinnungskaskade [Zwaal et al., 1992] und an verschiedenen apoptotischen Zellen [Fadok et al., 1992] gefunden. Man geht heute davon aus, dass die Exposition von PS als Signal zur Entfernung apoptotischer Zellen durch Phagozytose wirkt [Fadok et al., 2000].

Fusionsprozesse, Endo- und Exozytose

In der Regel fusionieren intakte Zellen, mit bestehender Phospholipidasymmetrie, nicht miteinander. Fusionsprozesse intrazellulärer Vesikel mit der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran können hingegen ständig ablaufen. Eine transversale Asymmetrie der Phospholipide in der Plasmamembran könnte dafür ein entscheidender Faktor sein. So beeinflussen die verschiedenen Phospholipide in unterschiedlichem Maße die fusogenen Eigenschaften einer Membran. Wichtige hierfür sind die effektive Molekülform (kegelförmig, zylinderförmig), der Sättigungsgrad der assoziierten Fettsäuren, das Maß der Hydratation der Kopfgruppen sowie deren elektrische Ladung. Aminophospholipide vereinen alle Eigenschaften, die eine Membranfusion erleichtern und sie können zudem in Anwesenheit von Kalzium Nichtbilayerstrukturen ausbilden. Die Änderung ihrer Verteilung über die Membran kann somit deren Fusogenität entscheidend beeinflussen. Eine zytoplasmatische Anreicherung der Aminophospholipide in synaptischen Vesikeln chromaffiner Granulae unterstützt wahrscheinlich deren kalziumabhängige Anlagerung an die zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran und anschließende Fusion. In Myoblasten wurde hingegen eine Exposition der Aminophospholipide auf dem exoplasmatischen Monolayer der Plasmamembran beschrieben. Die Fusion von Myoblasten untereinander führt während der Embryonalentwicklung zur Ausbildung der Skelettmuskulatur, eine fusogene Oberfläche der Myoblasten ist somit in der Genese essentiell (review: [Herrmann et al., 1991]). Entsprechend

dem „Bilayer-Couple“-Modell könnte außerdem die kontrollierte Aktivität von Phospholipidtranslokasen an bestimmten Punkten der Plasmamembran zu einer Ungleichverteilung von Membranlipiden zwischen den beiden Monolayern, somit zu örtlichen Membrankrümmungen und schließlich zum Abschnüren von Vesikeln führen. Auch dies könnte eine Kontrolle von Endo- und Exozytoseprozessen über die Phospholipidasymmetrie erklären [Devaux and Zachowski, 1994]. Die Verringerung der APLT-Aktivität geht z.B. bei aktivierten Thrombozyten mit der Aufhebung der Phospholipidasymmetrie und einem Abschnüren von Membranvesikeln einher.

Fluidität und Zellform

Bedingt durch die unterschiedliche Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Phospholipide und deren asymmetrische Verteilung innerhalb der Membran unterscheidet sich die Fluidität der zytoplasmatischen von der exoplasmatischen Seite. Die Fluidität der Zellmembran von Erythrozyten könnte zudem in engem Zusammenhang mit ihrer Zellform stehen [Seigneuret and Devaux, 1984].

Protein-Aktivität

Die transversale Asymmetrie beeinflusst des weiteren die laterale Beweglichkeit von integralen und verankerten Proteinen und damit auch ihre Aktivität. Zahlreiche membrangebundene Proteine (z.B. PKC, G-Proteine, AnnexinV) benötigen für ihre Aktivität die unmittelbare Nachbarschaft von PS. Viele Proteine des Zytosols müssen an die Plasmamembran binden, um Funktion und Informationsaustausch zu ermöglichen. Die Bindung erfolgt häufig an geladene Lipide, die bevorzugt im inneren Monolayer angereichert sind. Andererseits wird für ein Seminalplasmaprotein des Bullen (PDC-109) die Bindung an die ungeladene Kopfgruppe des PC beobachtet [Müller et al., 1998]. Eine Änderung der Phospholipidasymmetrie könnte somit direkt die Aktivität von Proteinen beeinflussen.

1.2.2 Lateral inhomogene Verteilung von Membranlipiden

1.2.2.1 Charakterisierung der lateralen Lipidverteilung

Untersuchungen zur lateralen Asymmetrie in biologischen Membranen erfolgen zum überwiegenden Teil mit Hilfe von markierten Lipidanaloga bzw. lipophilen Markern, die sich in den Bilayer einbauen. Der differenzielle Einbau und die Diffusion solcher Reporter kann mit verschiedenen Techniken verfolgt werden. In den letzten zwei Jahrzehnten wurden häufig präparative Methoden zur Untersuchung lateraler Lipiddomänen angewandt. Sie nutzen die unterschiedliche Resistenz von Membrandomänen gegenüber Detergenzien aus.

Die laterale Asymmetrie einzelner Membranbestandteile entwickelt sich wahrscheinlich analog zur transversalen Asymmetrie im Golgi-Apparat während der Passage von der cis- zur trans-Seite. Die Glykosylierung von Lipiden und Proteinen bewirkt zunehmend eine laterale Segregation in Membrandomänen. Man geht heute davon aus, dass im endoplasmatischen Retikulum die Membranlipide lateral gleichförmig verteilt sind, während sie in der Plasmamembran charakteristische Domäne bilden [Holthuis et al., 2003].

Entscheidend für diese asymmetrische Anordnung ist, im Gegensatz zur transversalen Asymmetrie der Phospholipide, die rein physikochemische Wechselwirkung zwischen spezifischen Lipiden, die zur Phasenseparation führen kann. Sowohl in Modellmembranen als auch in biologischen Membranen wurde gezeigt, dass Sphingolipide (Sphingomyelin und Glykosphingolipide) sich bevorzugt mit Cholesterol zusammenlagern und eine geordnet-fluide Phase bilden. Diese koexistiert stabil mit oder in der ungeordnet-fluiden Phase, in der sich vorwiegend ungesättigte Glycerolipide anreichern [Brown and London, 1998a]. Basierend auf der Vorstellung stabiler Lipiddomänen in einer sonst fluiden Membran entstand der Begriff der sogenannten „Rafts“ (Floß) [Simons and Ikonen, 1997].

Die auf der exoplasmatischen Seite der Plasmamembran geclusterten Sphingolipide haben i.d.R. lange, gesättigte Fettsäureketten, die bis in den zytoplasmatischen Monolayer hinein reichen können. Den starken Zusammenhalt solcher Lipiddomänen führt man auf ein ausgeprägtes Netzwerk von Wasserstoffbrücken zwischen den langgestreckten Fettsäureketten zurück. Der Platzbedarf der Glykosphingolipidkopfgruppen ist groß. Wahrscheinlich füllen Cholesterolmoleküle die Freiräume zwischen den gestreckten Fettsäureketten aus. Ob auf der zytoplasmatischen Seite spezielle Phospholipide angereichert sind, ist noch nicht bekannt. Es wurde aber diskutiert, dass Phospholipide mit überwiegend gesättigten Fettsäureketten die Packung einer solchen Mikrodomäne optimieren könnten [Simons and Ikonen, 1997]. In einigen Zellmembranen scheinen gesättigte Fettsäureketten vor allem mit PS und PE assoziiert zu sein [Schneider et al., 1999]. Diese Phospholipide könnten, in dem sonst sehr fluiden Monolayer, die zytoplasmatische Gegenseite von Rafts bilden [Holthuis et al., 2003]. Mit Lipidrafts assoziieren charakteristische, häufig mit einer gesättigten Fettsäurekette im Bilayer verankerte Membranproteine. Als typische Raftproteine gelten Glykosylphosphatidylinositol- (GPI) verankerte Proteine und zweifachacylierte Tyrosinkinasen der Src-Familie. Es wurden weiterhin einige Transmembranproteine mit Rafts assoziiert gefunden [Simons and Ikonen, 1997]. GPI-verankerte Proteine werden häufig als morphologische Marker für das Vorhandensein von Rafts auf der Zelloberfläche genutzt.

Über die Größe, Form und Dynamik lateraler Lipiddomänen gibt es nach wie vor weit auseinander gehende Meinungen (< 50-700 nm, gesamte apikale Plasmamembran von Epithelzellen). Dies liegt zum einen an der Vielzahl der genutzten Untersuchungstechniken, zum anderen aber auch am Fehlen einer genauen Definition. Einig ist man sich allerdings, dass man aus der Größe isolierter Lipiddomänen nicht auf die tatsächlich in vivo vorhandene Größe solcher Strukturen schließen kann [Hooper, 1999]. Eine präparative Isolation von Rafts (oder allgemein, geordnet-fluiden Lipiddomänen) kann über die Lyse der Membran in kaltem, nichtionischem Detergens (z.B. Triton) und eine anschließende Dichtezentrifugation erfolgen. Membrandomänen mit hohem Sphingolipid- und Cholesterolanteil können nicht solubilisiert werden, da sie von starken Van der Waals-Kräften zusammengehalten werden. Sie sind durch eine geringe Dichte charakterisiert (enthalten relativ wenig Proteine) und steigen während der Ultrazentrifugation im Dichtegradienten auf [Hooper, 1999]. Eine teilweise Detergensunlöslichkeit wurde allerdings auch für Membranen beschrieben, deren einheitliche Lipidphase sich zwischen der geordnet-fluiden und der ungeordnet-fluiden befand [Brown and London, 1998b].

1.2.2.2 Physiologische Relevanz lateralen Lipiddomänen

Den wichtigsten Hinweis auf die Beteiligung lateraler Lipiddomänen an der zellulären Regulation gaben funktionelle Untersuchungen. So beeinflusst der Einbau oder Entzug von Cholesterol in die Plasmamembran nicht nur deren Fluidität und laterale Organisation, sondern auch die Aktivität verschiedener Proteine und andere zelluläre Prozesse.

Lipid- und Proteinsortierung in sekretorischen Vesikeln

Die Sphingolipidsynthese findet überwiegend im Golgi-Apparat statt und ist damit räumlich von der Synthese der Phospholipide und des Cholesterols im endoplasmatischen Retikulum getrennt. Dies ist ein in allen Eukaryonten konserviertes Prinzip [van Meer, 1998] und scheint für die Membrangenese entlang des Golgi-Apparates von wesentlicher Bedeutung zu sein. Verbunden mit der lateralen Segregation von Sphingolipiden und Cholesterol nimmt auch die Dicke der Membranen zur trans-Seite des Golgi-Apparates zu. Es wurde ein Modell vorgeschlagen, nach dem sich die Proteine entsprechend ihrer hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Lipidbilayer selbst organisieren [Bretscher and Munro, 1993]. So haben typische Golgi-Enzyme grundsätzlich kürzere Transmembranregionen als Proteine der Plasmamembran und reichern sich dem entsprechend in sphingolipid- und cholesterolfreien Membranabschnitten an. Somit könnte man auch die unterschiedliche Zusammensetzung

sekretorischer Vesikel entsprechend ihres Zielortes erklären (review: [Holthuis et al., 2003]).

Fusionsprozesse, Endo- und Exozytose

Caveolae sind 50-70 nm große Membranflecken, denen eine besondere Rolle bei der Endo- und Exozytose, dem Lipidtransport und der Signaltransduktion in vielen Zellen zukommt. Sie sind durch die enge zytoplasmatische Assoziation mit einem cholesterolbindenden Protein namens Caveolin gekennzeichnet und können als in Detergens unlösliche Membranstrukturen isoliert werden. Caveolin assoziiert mit GPI-verankerten Proteinen und einem charakteristischen Sphingolipid (GM1) [Parton, 1994; Rothberg et al., 1990]. Obwohl Caveolae die bisher am besten untersuchte Membranstruktur darstellen, ist auch hier die genaue Lipidzusammensetzung noch unklar. Das Vorhandensein von Caveolin in Transportvesikeln führte zu der Annahme, dass es eine wesentliche Rolle bei der Vesikelbildung hat [Andersen, 1998]. Die Endozytose erfolgt in MDCK-Zellen über zwei verschiedene Wege. Es kann zwischen einer clathrinabhängigen und einer clathrinunabhängigen Endozytose unterschieden werden. Letztere kann durch den Entzug von Cholesterol beeinflusst werden und gilt daher als Raft-assoziiert [Simons and Ikonen, 1997]. Vor kurzem konnte auch für SNARE-Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive attachment protein receptors) eine Organisation in cholesterolabhängigen Mikrodomänen gezeigt werden. Man nimmt an, dass sie die „docking“ und Fusionsstellen für die Exozytose darstellen [Lang et al., 2001].

Signalübertragung

Sowohl für Transmembranproteine (z.B. IgE-Rezeptor, T-Zell-Rezeptor) als auch für zahlreiche GPI-verankerte Proteine (z.B. CD16, Kontaktin, uPAR) wurde eine Signalübertragung auf die mit diesen Proteinen assoziierten Tyrosinkinasen (Src-Familie) beschrieben. Die Aktivierung einer Signalkaskade wurde wiederholt durch Aggregation von GPI-verankerten Proteinen ausgelöst [Brown and London, 1998a]. Der Mechanismus der Signalübertragung von mit dem exoplasmatischen Monolayer assoziierten GPI-verankerten Proteinen auf die im zytoplasmatischen Monolayer gelegene Tyrosinkinasen ist unklar. Eine Vermittlung zwischen zytoplasmatischer und exoplasmatischer Seite könnte sowohl durch Transmembranproteine als auch durch die langen FS-Ketten der Lipide erfolgen [Dietrich et al., 2001].

1.3 Phospholipide in der Zell- und Akrosommembran von Spermienzellen

Die Differenzierung der Spermienzelle in verschiedene morphologisch zu unterscheidende Kompartimente (akrosomaler Bereich, Äquatoralsegment, postakrosomaler Bereich, Mittelstück, Schwanz) setzt sich auf molekularer Ebene fort. Die Zellmembran umgibt die gesamte Zelle, bildet jedoch kein Kontinuum. Da die Membranen eines Spermiums dicht benachbart und jeweils nur durch einen schmalen Zwischenraum voneinander getrennt sind, werden Untersuchungen zur Zusammensetzung und Organisation der Membranen erschwert.

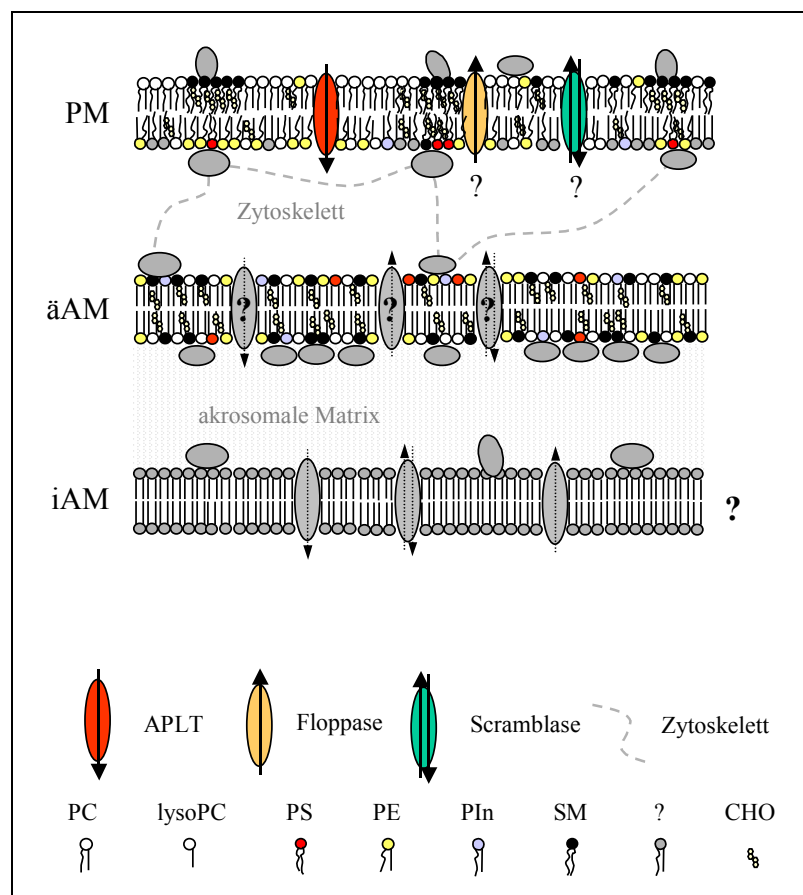


Abb. 3: Phospholipidorganisation in der Zell- und Akrosommembran von Säugetierspermien: Während die Plasmamembran (PM) in Analogie zu anderen Säugerzellen eine charakteristische transversale Asymmetrie und wahrscheinlich eine lateral inhomogene Verteilung der Phospholipide aufweist, gibt es über die Lipidorganisation der inneren und äußeren den Akrosommembran (iAM/äAM) bisher kaum Erkenntnisse.

Am intensivsten wurde die Plasmamembran (PM) von Spermien, speziell der die Kopfkappe überdeckende Teil, analysiert. Nur wenige Arbeiten untersuchten die Lipidzusammensetzung der Akrosommembranen. Abbildung 3 soll einen Überblick zum heutigen Kenntnisstand der Organisation der Phospholipide in Zell- und Akrosommembran von Säugetierspermien geben.

1.3.1 Zusammensetzung und Organisation der Akrosommembranen

Das Akrosom entsteht während der Differenzierung der Spermatiden aus Vesikeln des Golgi-Apparates. Man unterscheidet zwischen innerer (dem Zellkern zugewandt, iAM) und äußerer (der Plasmamembran zugewandt, äAM) Akrosommembran. Im Äquatorialbereich, am unteren Rand des Akrosoms, bilden beide Membranen eine haarnadelartige starre Struktur und gehen ineinander über. Einige Autoren vergleichen das Akrosom morphologisch mit einem riesigen sekretorischen Vesikel [Tulsiani and Abou-Haila, 2004]. Dementsprechend würde man für beide Akrosommembranen eine asymmetrische Organisation und Zusammensetzung, vergleichbar mit der Plasmamembran, erwarten. Andererseits können Diffusionsbarrieren im Äquatoralsegment eine unterschiedliche Struktur von innerer und äußerer Akrosommembran bewirken bzw. erhalten. Die wenigen Untersuchungen zur Lipidcharakteristik der äußeren Akrosommembran konnten tendenziell eine Phospholipidzusammensetzung vergleichbar mit der Plasmamembran zeigen (siehe Tabelle 1), wobei scheinbar ein Teil des PC in der äußeren Akrosommembran durch SM ersetzt wird. Zur Phospholipidzusammensetzung der inneren Akrosommembran gibt es bisher keine Literaturangaben.

Tab. 1: Zusammensetzung ausgewählter Spermienmembranen: relativer Protein- und Lipidgehalt sowie prozentualer Anteil der Phospholipidklassen (bezogen auf Gesamt-PL-Gehalt) in isolierten Membranen (äußere Akrosommembran – äAM, Plasmamembran die den Bereich der Kopfkappe überdeckt - Kopf-PM).

	Bulle [Parks et al., 1987]		Meer- schwein [Stojanoff et al., 1988]		Eber [Nikolopoulou et al., 1985]	Eber [Nikolopoulou et al., 1986]
	Kopf-PM	äAM	Kopf-PM	äAM	Kopf-PM	PM-äAM [#]
Protein/PL [w/w]	0,66	2,48 [*]	n.d.	n.d.	<1,92	1,92
CHO/PL [mol/mol]	0,38	0,26	n.d.	n.d.	0,26	0,26
PC	50	42	39	33	40	27
SM	13	17	18	18	23	31
PE	10	7	15	15	28	29
PIn	3	3	6	9	4	3
LysoPC	2	2	18	21	-	1
PS	1	2	4	4	3	9

^{*} fest mit der äAM assoziierte dichte Strukturen ließen sich nicht abtrennen

[#] Mischvesikel aus PM und äAM nach Induktion der AR mittels Ionophor

Einige Anhaltspunkte zur Membranorganisation der äußeren Akrosommembran (äAM) lieferten des weiteren mikroskopische und enzymatische Untersuchungen an verschiedenen

Säugerspermien. So untersuchten Kan und Lin die Phospholipidverteilung in den Membranen von Eberspermien mittels Gefrierbruchtechnik, kombiniert mit einer PhospholipaseA2-Gold-Markierung. Diese Versuche zeigten unter anderem, dass die Dichte der PhospholipaseA2-Markierung von der Kernmembran über die innere und äußeren Akrosommembran zur Plasmamembran hin abnimmt [Kan and Lin, 1996]. In Eberspermien wurde vor allem mit der zytoplasmatischen Seite der äAM assoziiertes Kalzium nachgewiesen. Dies könnte auf eine Anreicherung anionischer Lipide in diesem Monolayer hindeuten. Weiterhin konnte eine gleichförmige Markierung der äAM mit Neomycin, einem Marker für PIn, beobachtet werden [Berruti and Franchi, 1986]. Elektronenmikroskopische Bilder von Eberspermien nach Gefrierbruch zeigten außerdem eine kompakte Aufreihung hexagonaler, globulärer Partikel auf der zytoplasmatischen Seite der äAM [Forsman and Pinto da Silva, 1989]. Sowohl die iAM als auch die äAM besitzen kovalent gebundene Zucker, die durch Bindung verschiedener Lektine nachgewiesen wurden [Huang and Yanagimachi, 1985; Töpfer-Petersen et al., 1983]. Fest mit der periplasmatischen Seite der äAM assoziiert ist ein elektronendichtes Material, das nur schwer abgetrennt werden kann. Selbst nach Kavitation und Tritonlyse bleiben diese Strukturen der äAM erhalten. Eine saubere Aufreinigung der iAM scheitert ebenfalls an der sehr stabilen Struktur der Membran an sich und ihren Verbindungen zu anderen subzellulären Strukturen (akrosomale Matrix, Perforatorium). Die iAM widersteht sowohl einer Lyse in nichtionischem Detergens als auch einer Ultraschallbehandlung und enthält sehr viele integrale Partikel, die teilweise parakristalline Bereiche ausbilden. Die Fluidität der Membran ist wahrscheinlich relativ gering [Huang and Yanagimachi, 1985; Toshimori, 1998].

Während zahlreiche Proteine der iAM und der äAM beschrieben wurden und deren Funktion für die Zell-Zell-Wechselwirkung mit der Eizelle diskutiert wird, ist die Lipidorganisation in den Akrosommembranen noch immer weitgehend unklar. Weder für die innere noch für die äußere Akrosommembran wurde bisher eine transversale Asymmetrie oder ein Transport von Phospholipiden gezeigt.

1.3.2 Die Zellmembran von Spermienzellen

1.3.2.1 *Zusammensetzung*

Die Phospholipidzusammensetzung der Plasmamembran von Spermien verschiedener Spezies ist ähnlich und prinzipiell vergleichbar mit anderen Membranen tierischer Zellen. Tabelle 2 zeigt im Überblick die prozentualen Anteile der häufigsten Phospholipide (PL) in der Plasmamembran von Eber- und Forellenspermien. Im Vergleich zu humanen Erythrozyten ist

der Anteil an PC erhöht, dafür macht PS einen deutlich geringeren Anteil der Membranphospholipide aus. Die Plasmamembran der Forellenspermien enthält kaum SM. Von den Sterolen in der Plasmamembran stellt das Cholesterol (CHO) die Hauptkomponente dar. Sowohl Eberspermien als auch Forellenspermien zeichnen sich durch einen relativ geringen Cholesterolanteil in ihrer Plasmamembran aus. Das CHO/PL-Verhältnis beträgt 0,26 bzw. 0,33 während humane Spermienzellen z.B. ein CHO/PL von 0,83 aufweisen (humane Erythrozyten 0,89).

Tab. 2: Vergleich der Zusammensetzung der Plasmamembran verschiedener tierischer Zellen.

	Eber- spermien §	Forellen- spermien #	humane Spermien §	humane Erythrozyten &
Protein/PL [w/w]	1,26	2,64	k.A.	k.A.
CHO/PL [mol/mol]	0,26	0,33	0,83	0,89
PC	39	49	36	29
SM	22	3	20	27
PE	24	31	31	27
PIn	3	4	4	1
LysoPC	4	3	k.A.	1
PS	6	10	8	13

§ [Buhr et al., 1994; Parks and Lynch, 1992]; # berechnet aus Quelldaten von [Labbé et al., 1995]; § Angaben für Gesamtzellsuspension [Grizard et al., 2000; Mack et al., 1986]; & [Alouf and Freer, 1992; Baldini et al., 1989]

Die Zellmembran von Eberspermien enthält im Vergleich zu anderen tierischen Zellen einen hohen Anteil an PC- und PE-Plasmalogenen. Diese sind durch eine veretherte, gesättigte Fettsäure (meist 16:0 oder 18:0) am C1 und eine veresterte, mehrfach ungesättigten Fettsäure (20:4, 22:5, 22:6) am C2 des Glyzerolgerüsts charakterisiert. Ungesättigte Fettsäuren findet man zudem häufig mit PS assoziiert, während PIn, Diacylglycerin und wahrscheinlich SM zum überwiegenden Teil gesättigte Fettsäuren (SM zu 53%, 20:0) tragen [Buhr et al., 1994; Nikolopoulou et al., 1986; Parks and Lynch, 1992]. Brenton et al. berichten jedoch vom Vorkommen extrem langkettiger, ungesättigter Fettsäuren (Eber: *n-6*; C20-34; 3-5 Doppelbindungen) am SM verschiedener Säugerspermien [Robinson et al., 1992]. Die Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Phospholipidklassen scheint bei den Forellenspermien vergleichbar mit Eberspermien zu sein. PC und PE sind jeweils mit einer kurzen, gesättigten oder einfach ungesättigten Fettsäure (16:0, 18:1) und einer längeren mehrfach gesättigten Fettsäure (22:6, 20:5, 20:4) assoziiert. PS trägt zum überwiegenden Teil ungesättigte Fettsäuren (18:1, 22:6), PIn hingegen überwiegend gesättigte (16:0, 18:0, 18:1)

Fettsäuren [Labbé et al., 1995].

1.3.2.2 Transversale Asymmetrie

In der Plasmamembran der Spermien von Forelle, Schafbock, Ziege, Bulle und Eber wurde eine charakteristische transversale Asymmetrie der Phospholipide nachgewiesen. Diese Asymmetrie beruht, wie bei anderen Zellen, auf der Aktivität einer Aminophospholipidtranslokase (APLT). Die Aminophospholipide PS und PE werden sehr schnell und effizient auf die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran transportiert [Müller et al., 1994b; Nolan et al., 1995]. Für Forellenspermien zeigten Müller et al. mit spinmarkierten Phospholipidanaloga, dass mehr als 90% des PS und 80-85% des PE auf der zytoplasmatischen Seite angereichert werden. Sie konnten mit diesen Messungen des weiteren eine höhere Fluidität des inneren Monolayers im Vergleich zum äußeren nachweisen [Müller et al., 1994a]. Gadella et al. zeigten für die Zellmembran von Eberspermien, dass sich 96% des PS, 80% des PE, 18% des PC und 4% des SM im inneren Monolayer der Plasmamembran befinden. Die Bewegung der Phospholipide von der inneren zur äußeren Membranseite erfolgt in intakten Zellen sehr langsam [Gadella et al., 1999b]. Erst kürzlich gelang es eine ATP abhängige APLT zu identifizieren, die ausschließlich in der akrosomalen Region von Mäusespermien exprimiert wird [Wang et al., 2004]. Nach Ausschalten des entsprechenden Enzyms fanden die Autoren die Spermien dieser Knockout-Mäuse morphologisch und hinsichtlich der Motilität unverändert. Im Gegensatz zum Wildtyp zeigten zahlreiche Spermien der Knockout-Mäuse eine intensive AnnexinV-Bindung, was für eine Exposition von PS auf der exoplasmatischen Seite der Plasmamembran spricht [Wang et al., 2004].

1.3.2.3 Laterale Ungleichverteilung

In den 70er Jahren fand man erste Anhaltspunkte für eine laterale Heterogenität der Zellmembran von Spermien. So wurde zunächst eine über den Spermienkopf differenzierte Lektinbindung und eine polarisierte Verteilung von integralen Membranproteinen beobachtet. Diese laterale Organisation der Zellmembran in Domänen konnte schließlich auch für anionische Lipide (Polymyxin B) und Sterole (Filipin) gezeigt werden [Bearer and Friend, 1980; Suzuki and Yanagimachi, 1989]. Sowohl Polymyxin als auch Filipin markierten den apikalen Bereich der Kopfkappe besonders intensiv. Für ein fluoreszenzmarkiertes Seminolipid wurde bei Eberspermien die gleiche Anreicherung im apikalen Randbereich beschrieben [Gadella et al., 1994]. Die Lipidpackungsdichte variiert ebenfalls zwischen

verschiedenen Bereichen der Zellmembran. So markiert Merocyanin (M540) vor allem den Bereich über dem Akrosom und Mittelstück [Schlegel et al., 1986]. Es wird diskutiert, ob die Ausbildung von solchen Gebieten unterschiedlicher Lipid- und Proteinzusammensetzung durch Wechselwirkungen mit der Glykokalyx oder dem Zytoskelett bedingt ist [Flesch and Gadella, 2000].

Zahlreiche Untersuchungen zur Fluidität der Zellmembran von Säugerspermien weisen des weiteren auf eine Phasenseparation der Membranlipide hin. So fanden z.B. Wolf et al. bei Schafbockspermien mittels Differential-Scanning-Kalimetrie zwei endotherme Phasenübergänge bei 26°C und 60°C, die auf eine Separation der Lipide innerhalb der flüssigkristallinen Phase hindeuten. Für Eberspermien wurden vergleichbar Phasenübergänge bei 24°C und 36°C beschrieben. Verschiedene Fluoreszenzlabel zeigten zudem eine eingeschränkte laterale Diffusion (FRAP) in der Zellmembran und in rekonstituierten Bilayern aus diesen Membranlipiden, was auf laterale Diffusionsbarrieren hinweist. Die Ursache für eine Phasenseparation der Membranlipide in Spermienzellen wurde unter anderem einem spermienpezifischen Glykolipid und den Plasmalogenen zugeordnet [Parks and Lynch, 1992; Wolf, 1995]. Neuere Arbeiten ließen allerdings Zweifel aufkommen, ob man von diesen Versuchen tatsächlich auf das Vorhandensein koexistierender Lipidphasen in der Zellmembran intakter Spermien schließen kann. Vielmehr scheinen die Unterschiede (i) vom differentiellen Einbau der Marker in intrazellulären Membranen und toten Zellen, oder (ii) von Präparationsartefakten herzurühren [Flesch and Gadella, 2000]. In verschiedenen Säugerspermien wurde die gleichförmige Markierung einer einheitlichen flüssig-kristallinen Phase (Laudan) und eine 90%ige Fluoreszenzherstellung nach Fluoreszenzlöschung (FRAP) in lebenden Zellen beobachtet [Ladha et al., 1997; Wolfe et al., 1998]. Sowohl aus Seeigel, als auch aus Meerschweinchen- und Mäusespermien konnten aber in Triton unlösliche Membranfraktionen charakteristischer Zusammensetzung isoliert werden, was wiederum für das Vorhandensein von Lipiddomänen (sogenannten Rafts) spricht [Ohta et al., 2000; Travis et al., 2001; Trevino et al., 2001]. Zur laterale Lipidorganisation in der Zellmembran von Forellenspermien gibt es bisher keine Untersuchungen.

1.4 Membranveränderungen während der Kapazitation und Akrosomreaktion

Es sei hier noch einmal darauf hingewiesen, dass man unter einer Kapazitation allgemein die Vorbereitung der Säugerspermien auf die Akrosomreaktion versteht. Die genaue Abfolge einzelner Prozesse und deren unmittelbare Wirkung ist bis heute nicht geklärt. Die

Destabilisierung der Plasmamembran und der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration gelten jedoch für alle Säugerspermien als Schlüsselereignisse von Kapazitation und Akrosomreaktion.

1.4.1 Entfernung assoziierter Proteine von der Spermienoberfläche

An der Oberfläche frisch ejakulierter Eberspermien binden viele Millionen Seminalplasmaproteine, die durch Selbstaggregation eine mehrschichtige Proteinhülle über dem vorderen Teil des Spermienkopfes bilden. Diese basischen Proteine, Spermadhäsine (12-14 kDa) genannt, lösen sich zusammen mit ebenfalls assoziierten Proteaseinhibitoren im Laufe der Kapazitation zu mehr als 90% wieder von der Spermienoberfläche ab. Spermadhäsine sind multifunktionelle Proteine, die in Abhängigkeit von ihrem Aggregationszustand an bestimmte Phospholipide (z.B. AWN-1 in seiner monomeren Form selektiv an PE), an Heparin, Glykosaminoglukane und die Zona pellucida binden [Töpfer-Petersen et al., 1996]. Es ist allerdings noch unklar, wodurch die Ablösung der Oberflächenproteine ausgelöst wird. Denkbar wäre z.B. eine mechanische Ablösung infolge der aktiven Schwimmbewegung der Spermien und/oder bedingt durch die kompetitive Assoziation dieser Proteine mit Heparin oder Glykosaminoglukanen, die beide die Kapazitation von Eberspermien fördern [Martínez and Morros, 1996]. Die Entfernung der Proteine bildet wahrscheinlich den ersten Schritt zur Destabilisierung der Zellmembran und kann zum einen den Entzug von Cholesterol aus der Plasmamembran erleichtern, zum anderen aber auch direkt deren Permeabilität beeinflussen.

1.4.2 Entzug und Umverteilung von Cholesterol

Für verschiedene Säugerspermien wurde gezeigt, dass deren Kapazitation mit der Verringerung des CHO/PL der Zellmembran einhergeht (review: [Cross, 1998; Visconti et al., 1999]. Einen damit verbundenen Cholesterolentzug vermitteln wahrscheinlich lipidbindende Proteine des weiblichen Genitaltraktes, in vitro kann dies auch durch Rinderserumalbumin (BSA) erfolgen [Davis et al., 1979; Ehrenwald et al., 1988]. Eine Veränderung der Filipin-Sterol-Komplexe in der den Spermienkopf überdeckenden Plasmamembran nach Kapazitation wurde ebenfalls beobachtet. In Goldhamsterspermien nahm die Dichte der Komplexe im akrosomalen Bereich ab [Cross, 1998]. Für Humanspermien wurde die Ausbildung von kleinen sterolfreien Gebieten in dem sonst unverändert dicht markierten Bereich der Kopfkappe beobachtet. Der postakrosomale Bereich kapazitierter Spermien enthielt nur sehr wenige Filipin-Sterol-Komplexe [Tesarík and Fléchon, 1986]. Bisher nahm man an, dass

einem Cholesterolentzug bei Eberspermien keine Bedeutung zukommt, da ihre Kapazitation auch in BSA-freiem Medium möglich ist. Flesch et al. beobachteten allerdings an kapazitierten Eberspermien einen völligen Sterol-Verlust aus dem postakrosomalen Bereich, während die Dichte der Filipin-Sterol-Komplexe im akrosomalen Bereich unverändert erschien. Der analytisch-biochemisch nachgewiesene BSA-vermittelte Cholesterolentzug aus der Plasmamembran war auf eine relativ kleine Subpopulation kapazitierter Eberspermien mit geringer Lipidpackungsdichte der Zellmembran (Merocyanin) beschränkt. In den restlichen Zellen blieb der Cholesterolgehalt unverändert. Die Abnahme der Lipidpackungsdichte der Plasmamembran in einem Teil der Zellen war von der Anwesenheit von Bikarbonat im Medium abhängig [Flesch et al., 2001].

1.4.3 Permeabilität der Membran

Untersuchungen an Fibroblasten zeigen, dass der Cholesterolgehalt der Zellmembran die Aktivität eines Na^+/H^+ -Antiporters und in Erythrozyten die eines Cl^-/HCO_3^- -Austauschers moduliert. Ähnliche Effekte auf die Ionenpermeabilität könnte ein Cholesterolentzug aus der Plasmamembran von Säugerspermien haben [Cross, 1998]. Im Zuge der Kapazitation wurde teilweise ein Anstieg vom intrazellulären Kalzium und cAMP sowie eine pH-Erhöhung beobachtet. Über die Zusammenhänge dieser Effekte gibt es noch wenig Klarheit. Man geht allerdings von einer oder mehreren bikarbonatinduzierten kalziumabhängigen intrazellulären Reaktionskaskaden aus [Visconti et al., 2002]. So soll Bikarbonat die Kapazitation von Eberspermien insofern fördern, als es die Aufnahme von Kalzium in die Zelle unterstützt. Der Anstieg des intrazellulären Kalziums erfolgt während der Kapazitation zunächst langsam, wofür die Deaktivierung einer Ca^{2+} -ATPase verantwortlich sein könnte [Fraser, 1995]. Im Zusammenhang mit der in einigen Säugerspermien beobachteten Hyperpolarisation der Zellmembran wird hingegen die Beteiligung von Kaliumkanälen und spannungsabhängigen Kalziumkanälen diskutiert [Visconti et al., 2002]. Bikarbonat aktiviert des weiteren eine Adenylatzyklase, deren Aktivität zum Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führt [Okamura et al., 1985].

1.4.4 Phosphorylierung und Umverteilung von Membranproteinen

Kapazitationsbedingte Änderungen der Protein-Tyrosin-Phosphorylierung wurden in zahlreichen Säugerspermien nachgewiesen. Bei allen Arten, auch beim Eber, wurde eine Abhängigkeit der Phosphorylierung von BSA, Bikarbonat, Kalzium sowie die Beteiligung

einer cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) beschrieben [Visconti et al., 2002]. Die Phosphorylierungsreaktionen beeinflussen die Spermienbindung an die Zona pellucida, die Akrosomreaktion und die Hyperaktivierung der Spermien. Flesch et al. wiesen an kapazitierten Eberspermien die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen der Plasmamembran nach, die eine hohe Bindungsaffinität zu Komponenten nativer Zona pellucida zeigten [Flesch et al., 1999]. Des weiteren kommt es, während der Kapazitation zur lateralen und transversalen Umverteilungen von Membranproteinen. Für humane Spermien wurde beispielsweise die Translokation eines an der Zona-pellucida-Bindung beteiligten Proteins aus dem Inneren der Zelle auf die äußere Seite der Plasmamembran beschrieben [Benoff et al., 1993]. Mittels Immunohistochemie konnte außerdem eine Umorientierung (Kopf → Schwanz) und Aggregation bestimmter Proteine sowie die Ausbildung proteinfreier Areale im Bereich der Kopfkappe beobachtet werden [Saxena et al., 1986a; Töpfer-Petersen et al., 1996]. Eng verbunden mit der Umverteilung von Membranproteinen ist wahrscheinlich die Veränderungen der Lipidorganisation in der Zellmembran.

1.4.5 Lipide – Umverteilung, laterale Diffusion, Packungsdichte, fusogene Lipide

Analog zur Umverteilung von Membranproteinen wurden laterale und transversale Veränderungen der Lipidstruktur beschrieben. Gadella et al. zeigten z.B. eine kalziumabhängige Umverteilung eines spermien-spezifischen Glykolipides (Seminolipid) vom apikalen Rand in das Äquatoralsegment [Gadella et al., 1994]. Damit verbunden könnten laterale Lipiddomänen, hervorgerufen durch Phasenseparation, aufgehoben werden.

Einige Arbeiten deuten auf eine kapazitationsbedingte Beschleunigung der lateralen Diffusion von Membranlipiden hin. So beobachteten Wolf et al. in Mäusespermien einen Anstieg der Diffusionsgeschwindigkeit eines Lipidanalogons im vorderen Kopfbereich, Mittelstück und Schwanz, während im postakrosomalen Bereich die Diffusionsgeschwindigkeit abnahm [Wolf et al., 1986].

Als weiterer wesentlicher Kapazitationseffekt wird die Abnahme der Lipidpackungsdichte (Merocyanin) im Bereich der Kopfkappe beschrieben. Harrison et al. beobachteten dies zuerst an kapazitierten Eberspermien [Harrison et al., 1996]. In späteren Arbeiten wurde die Intensitätszunahme der Merocyaninmarkierung kapazitierter Spermien in Verbindung mit einem Scrambling der Phospholipide in der Plasmamembran diskutiert [Gadella and Harrison, 2000]. Die Arbeiten von Wang et al. schließen hingegen einen direkten Zusammenhang von intensiver Merocyaninmarkierung und PS-Exposition auf der exoplasmatischen Seite der

Plasmamembran (AnnexinV-Bindung) aus. Durch homologe Rekombination wurde das Enzym einer APLT ausgeschaltet. Mäusespermien vom Wildtyp zeigten kapazitationsbedingt eine deutliche Intensitätszunahme der Merocyaninmarkierung zahlreicher Zellen, während nur relativ wenige Spermien eine schwache AnnexinV-Bindung aufwiesen. Im Gegensatz dazu konnte AnnexinV, unabhängig von der vorherigen Inkubation der Zellen, an zahlreiche Spermien der Knock-out-Mäuse binden. Eine intensive Merocyaninmarkierung wurde jedoch an diesen Zellen nie beobachtet [Wang et al., 2004].

Eine kapazitationsbedingte Akkumulation anionischer Lipide im Bereich der Kopfkappe wurde als Voraussetzung für die nachfolgende Akrosomreaktion postuliert [Langlais and Roberts, 1985]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Meerschweinspermien zeigten eine Zunahme der Bindung von Polymyxin B an der apikalen Plasmamembran nach Kapazitation [Bearer and Friend, 1982]. In Humanspermien fanden Tesarik et al. jedoch keine kapazitationsbedingte Anreicherung anionischer Lipide [Tesarik and Fléchon, 1986]. Für die Ausbildung fusogener Lipidbereiche in der apikalen Plasmamembran wird einerseits die kalziumabhängige Aktivierung der Phospholipase A_2 verantwortlich gemacht. Die enzymatische Hydrolyse der am C2 des Glycerolgerüsts gebundenen Fettsäuren verursacht eine vorübergehende, örtliche Anreicherung von ungesättigten Fettsäuren und Lysophospholipiden, die beide eine Membranfusion fördern [Langlais and Roberts, 1985]. Andererseits wurde die Synthese und Anreicherung von Cardiolipin und Phosphatidsäure in kapazitierten Meerschweinspermien nachgewiesen [Bearer and Friend, 1982]. Ein Scrambling der Phospholipide in der apikalen Plasmamembran könnte eine Anreicherung anionischer Lipide in der äußeren Lamelle der Plasmamembran erklären [Flesch and Gadella, 2000].

1.4.6 Akrosomreaktion

Unter einer Akrosomreaktion versteht man allgemein die Fusion von Plasmamembran und äußeren Akrosommembran an mehreren Punkten [Yanagimachi, 1994]. Sie wird häufig mit der kalziumabhängigen Exozytose in somatischen Zellen verglichen [Tulsiani and Abou-Haila, 2004]. Während der Kapazitation kommt es wahrscheinlich unterstützt durch die Polymerisation von F-Aktin zur Zusammenlagerung von Zell- und Akrosommembran [Breitbart, 2002]. Induziert durch einen massiven Kalziumeinstrom erfolgt schließlich die Exozytose des akrosomalen Inhalts.

Das Äquatoralsegment verbleibt nach der Akrosomreaktion als starre Struktur, geformt aus Resten der inneren und äußeren Akrosommembran sowie der verbleibenden Plasmamembran,

und bildet den Ausgangspunkt für die Fusion des Spermiums mit der Eizelle [Bedford, 1969]. Die Fusion mit der Eizelle ist wahrscheinlich ein proteinvermittelter Prozess ähnlich der Virusfusion, wobei die daran beteiligten Proteine möglicherweise erst nach erfolgreicher Akrosomreaktion auf der Spermienoberfläche zugänglich sind [Arts et al., 1997].

Phospholipidvesikel, die negativ geladene Lipide enthalten, fusionieren nach erfolgreicher Akrosomreaktion fast ausschließlich mit dem Äquatoralsegment frisch ejakulierter Spermien vom Rind bzw. Menschen [Arts et al., 1993]. Für Lipidanaloga, die im Äquatoralsegment von akrosomreagierten Humanspermien durch Fusion mit Phospholipidvesikeln eingebaut wurden, konnte eine Diffusionsschranke in der inneren und äußeren Membranlamelle nachgewiesen werden. Die Stabilität dieser Transmembranbarriere wird von der Anwesenheit bivalenter Kationen bestimmt. Es ist unklar, ob es sich um Proteinbarrieren oder andere Strukturen handelt [Arts et al., 1994].

Veränderungen in der Organisation der Membranlipide scheinen für das Erlangen der Befruchtungsfähigkeit Voraussetzung zu sein und beeinflussen entweder unmittelbar die Fusionskompetenz der Membran oder führen zu Modifikationen der Protein-Lipid-Wechselwirkungen.

1.5 Ziel der Arbeit

Die transversale Asymmetrie der Phospholipide in der Zellmembran von Spermien wird durch die Aktivität einer APLT aufrecht gehalten. Dies gilt als wichtige Voraussetzung für die Homöostasis und die volle Funktionsfähigkeit der Zelle. Auch lateral findet man über die verschiedenen Strukturbereiche der Zelle (akrosomaler Bereich, Äquator, Postakrosom, Mittelstück, Schwanz) eine heterogene Organisation der Membran. Widersprüchlich sind hingegen die Ergebnisse zur Existenz von Lipiddomänen und Diffusionsbarrieren in der Zellmembran von Säugerspermien. Eine transversale und laterale Ungleichverteilung der Phospholipide in der äußeren Akrosommembran kann in Analogie zu sekretorischen Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerkes somatischer Zellen angenommen werden, wurde aber bisher nicht untersucht.

Zahlreiche Untersuchungen weisen auf eine transversale und laterale Umverteilung von Lipiden und Proteinen während der Kapazitation hin. Dies ist wahrscheinlich eine wesentliche Voraussetzung für die Schaffung fusogener Membrandomänen in der Zell- und Akrosommembran. Während man unter der Kapazitation einen bisher nicht klar zu definierenden Reifungsprozess ejakulierter Spermien versteht, ist die Akrosomreaktion relativ

deutlich durch eine Membranfusion im akrosomalen Bereich des Spermienkopfes gekennzeichnet. Allgemein gilt die Akrosomreaktion als ein Exozytoseprozess, bei dem die zytoplasmatischen Seiten von Plasmamembran und äußerer Akrosommembran fusionieren.

Ausgangspunkt dieser Arbeit bildeten folgende Fragestellungen:

Wird die bestehende Asymmetrie der Phospholipide der Plasmamembran lebender Spermien kapazitationsbedingt aufgehoben bzw. vermindert?

Findet eine schnelle, kalziumabhängige Umverteilung der Phospholipide in der Plasmamembran statt, die auf eine „Scramblase“-Aktivität schließen lässt?

Weisen die Phospholipide in der inneren und/oder der äußeren Akrosommembran eine transversale Asymmetrie auf?

Ändert sich die transversale Organisation der Phospholipide in den Akrosommembranen während der Kapazitation?

Ist eine kapazitationsbedingte Änderung der Phospholipidorganisation in den untersuchten Spermienmembranen Voraussetzung für die folgende Akrosomreaktion und/oder die Wechselwirkungen mit den Eizellhüllen?

Wie sind die Phospholipide in den Fusionsvesikeln (zwischen Zell- und Akrosommembran) organisiert?

Kann man daraus auf den Mechanismus des Fusionsprozesses schließen?

Existieren oder entstehen laterale Phospholipiddomäne in Zell- und Akrosommembran?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

AnnexinV-Fluoreszein-5-Isothiozyanat, APOPTEST™-FITC
KIT (FITC-AnV)
AnnexinV-Alexa™-594 (Alexa-AnV),
AnnexinV-Biotin, APOPTEST™-BIOTIN (Biotin-AnV)

VPS Diagnostics
(Hoeven, Holland)

Arachis hypogaea (peanut) Agglutinin-FITC (FITC-PNA),
Rinderserumalbumin (BSA),
CaCl₂(*2H₂O), Kalziumionophor A-23187,
Dithionit (Na₂S₂O₄), Dimethylsulfoxide (DMSO),
Ethanol, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Glucose
Heparin (H3149, 170 USP units/mg), HEPES,
Kanamycin, KCl, Merocyanin 540 (M540), MgCl₂, MgSO₄
Na-Citrat, NaCl, NaHCO₃, NaH₂PO₄, Na-Laktat-Sirup,
Pisum Sativum Agglutinin-FITC (FITC-PSA),
Protease Inhibitor Cocktail (P8340), Rhodamin 123 (R123)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)

SIGMA-ALDRICH
(Taufkirchen, Deutschland)

Na-Pyruvat, Percoll

Biochrom
(Berlin, Deutschland)

Arachis hypogaea (peanut) Agglutinin-Alexa Fluor 594 (Alexa-
PNA), Propidiumjodid (PI)

MoBiTec
(Göttingen, Deutschland)

1-acyl-2-[6-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]caproyl]-
sn-glycero-3-phosphatidylserin (C₆-NBD-C16-PS, NBD-PS),
1-acyl-2-[6-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]caproyl]-
sn-glycero-3-phosphatidylcholin (C₆-NBD-C16-PC, NBD-PC)

Avanti Polar Lipids
(Alabaster, USA)

Anti-Biotin-Antikörper (810.088 EM, Ziege, 10nm Gold)

BIOTREND
(Cologne, Deutschland)

Paraformaldehyd, Glutaraldehyd, LR-White

AGAR Scientific
(Stansted, England)

Bleicitrat, EPON 812
Osmiumtetroxid, Uranylacetat

SERVA
(Heidelberg, Deutschland)

2.2 Lösungen

Zur Flüssigkonservierung von Eberspermien wurde eine modifizierte Beltsvill-Thawing-Lösung (BTS) genutzt. Tabelle 3 zeigt im Überblick die Zusammensetzung dieser wie auch der im weiteren Text beschriebenen Lösungen.

Die In-vitro-Kapazitation der Eberspermien erfolgte in einem modifizierten Tyrodemedium (TALP). Eine sehr ähnliche Zusammensetzung weist Hank's gepuffertes Tyrodemedium

(HBT) auf. Es wurde in einigen Versuchen alternativ zum TALP eingesetzt. Beide Kapazitationsmedien wurden in einem Zellkulturschrank mit 5% CO₂ gesättigt, um das Bikarbonatgleichgewicht und somit den pH-Wert einzustellen.

In einigen Versuche erfolgte die AnnexinV-Markierung der Spermien, entsprechend den Empfehlungen des Herstellers, in einem Bindungspuffer. Entscheidend für die Bindung des AnnexinV an endogenes PS ist die Anwesenheit von mindestens 1,8 mM CaCl₂ im Medium.

Tab. 3: Zusammensetzung der eingesetzten Lösungen: BTS - modifizierte Beltsville-Thawing-Lösung, TALP – modifiziertes Tyrodemedium, HBT – Hank's gepuffertes Tyrodemedium; BP – Bindungspuffer; alle in Aqua bidest; pH 7,4; 300mOsmol.

	BTS [mM]	TALP [mM]	HBT [mM]	BP [mM]
NaCl	-	100,0	105,0	150,0
NaHCO ₂	15,0	20,0	15,0	-
NaH ₂ PO ₄	-	0,4	0,3	-
(Na-)Laktat	-	20,0	21,7	-
Na-Zitrat	23,0	-	-	-
KCl	10,0	2,7	3,1	5,0
MgCl ₂	-	0,5	-	1,0
MgSO ₄	-	-	0,4	-
HEPES	-	10,0	20,0	10,0
Glukose	205,0	6,0	5,0	-
(Na-)Pyruvat	-	1,0	1,0	-
CaCl ₂	-	2,0	2,0	1,8
EDTA	3,7	-	-	-
BSA	-	6mg/ml	3mg/ml	-
Gentamycin	300µg/ml	-	-	-
Kanamycin	-	-	100µg/ml	-

2.3 Eberspermien

Für die Versuche standen flüssigkonservierte Spermien von Ebern der Rasse Piétrain, vereinzelt auch der Rassen Duroc, Deutsches Edelschwein, Deutsche Landrasse und Leicoma zur Verfügung. Die Aufarbeitung der Ejakulate erfolgte ganzjährig in Besamungseberstationen nach standardisierten Protokollen. Die Ejakulate wurden in BTS auf ca. $2\text{--}3,5 \cdot 10^7$ Spermien/ml verdünnt und in geschlossenen Plastiktuben (ca. 90 ml) bei 17°C gelagert. Unter diesen Bedingungen bleiben Eberspermien mehrere Tage befruchtungsfähig.

Vor jedem Versuchstag wurden die verwendeten Eberspermien hinsichtlich ihrer Motilität und Morphologie mikroskopisch beurteilt. Diese Untersuchungen erfolgten im spermatologischen Labor des Instituts für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönnow e.V. (IFN). Als Mindestanforderung für den Praxiseinsatz bei der künstlichen

Besamung gelten bei flüssigkonservierten Eberspermien 65% motile und 75% morphologisch intakte Spermien. Weitere Untersuchungen zur Einschätzung der Spermienqualität, wie z.B. ein Thermoresistenztest (Inkubation der in BTS flüssigkonservierten Spermien bei 38,5°C bis zu 5 h) oder ein Kapazitationstest (Auslösbarkeit der Akrosomreaktion durch Zugabe eines Kalziumionophors) erfolgten für ausgewählte Proben ebenfalls im IFN.

2.3.1 Kapazitation

Um Spermien in vitro zu kapazitieren, wurden spezielle Medien entwickelt, die in etwa dem natürlichen Ionenmilieu einer In-vivo-Kapazitation im Eileiter des weiblichen Tieres entsprechen. Die flüssigkonservierten Eberspermien müssen zunächst in dieses Medium überführt werden. Dabei wird auch das in den flüssigkonservierten Proben enthaltene Seminalplasma entfernt. Für eine erfolgreiche Kapazitation von Eberspermien ist des weiteren eine Temperatur von 38-39°C erforderlich.

Protokoll - Kapazitation IFN

- 3 ml flüssigkonserviertes Ebersperma + 2 ml TALP
- Zentrifugation 6 min, 600×g (langsames Beschleunigen und Abbremsen!)
- Überstand bis auf 1 ml absaugen und mit 1 ml TALP auffüllen
- vorsichtiges Resuspendieren des Spermienpellets
- Zentrifugation 6 min, 600×g (langsames Beschleunigen und Abbremsen!)
- Überstand bis auf 0,5 ml absaugen und mit 1,5 ml TALP auffüllen
- Pellet vorsichtig resuspendieren ($\sim 3 \times 10^7$ Zellen/ml)
- Zugabe von 6 µg/ml (1,18 USP/ml) Heparin zur Spermisuspension
- Inkubation im Thermoblock bei 38,5°C für 45 min

Die Versuche wurden nach einem Standardprotokoll (IFN) zur Kapazitation von Eberspermien durchgeführt. Abweichend von diesem Standardprotokoll wurden Kontrollexperimente durchgeführt, in denen einzelne Komponenten des Kapazitationsmediums variiert wurden (BSA, Heparin, CaCl₂). Eine Inkubation im Zellkulturschrank mit 5% CO₂ wurde getestet und die Inkubationszeit variiert. Diese Abweichungen vom Protokoll „Kapazitation IFN“ sind im Ergebnisteil ausgewiesen.

Für einige Versuche wurde das flüssigkonservierte Ebersperma über einen Percoll-Dichtegradienten nach dem Protokoll von Harrison et al. aufbereitet [Harrison et al., 1993].

Diese Methode bietet die Möglichkeit, motile Spermien anzureichern und sehr effektiv von Zytoplasmatropfen, Seminalplasma und anderen Verunreinigungen zu trennen.

Protokoll - Kapazitation Harrison

- Percollgradienten im Reagenzglas schichten: 2 ml / 70% (vol/vol);
3 ml / 35% (vol/vol)
- 3 ml flüssigkonservierte Eberspermien vorsichtig überschichten
- Zentrifugation 5 min / 200×g; 15 min / 900×g
- Überstand vorsichtig absaugen
- Pellet im Kapazitationsmedium resuspendieren ($\sim 1 \times 10^7$ Zellen/ml)
- Inkubation im Zellkulturschrank mit 5% CO₂ bei 38,5°C für 2 h

Wie bereits bei der „Kapazitation IFN“ beschrieben, wurden auch bei dieser Methode verschiedene Faktoren variiert, wie im Ergebnisteil angegeben.

Versuche, bei denen eine Markierung der Plasmamembran mit fluoreszenzmarkierten Phospholipidanaloga vorgenommen wurde, erfolgten in BSA-freiem TALP. Die Kapazitation erfolgte im Zellkulturschrank mit 5% CO₂. Nach Harrison et al. ist eine Kapazitation von Eberspermien allein in Gegenwart von Bikarbonat möglich [Harrison et al., 1993].

Als sichtbares Indiz der Kapazitation von Eberspermien gilt unter anderem die zunehmende Agglutination der Spermien. Dies ist bereits makroskopisch im Reagenzglas bzw. im Zellkulturschälchen zu erkennen. Ein weiteres gut sichtbares Zeichen ist die Änderung der Bewegungsform der Spermien, die mikroskopisch beurteilt werden kann. Es kommt zur Hyperflagellation, die durch größere Amplitude und Frequenz der Kopfauslenkung gekennzeichnet ist. Diese beiden Kapazitationsmerkmale wurden bei allen Inkubationen in unterschiedlichem Ausmaß beobachtet. Der klassische Nachweis einer erfolgreichen Kapazitation ist die Auslösbarkeit der Akrosomreaktion.

2.3.2 Akrosomreaktion

Die Akrosomreaktion kann bei kapazitierten Eberspermien durch Zugabe eines Kalziumionophors (z.B. A-23187) ausgelöst werden. Die Versuche wurden nach einem Standardprotokoll zur Induktion der Akrosomreaktion von Eberspermien IFN durchgeführt.

Protokoll - Akrosomreaktion

- Resuspendieren der zuvor kapazitierten Spermien durch vorsichtiges Schwenken
- 1 ml Spermiesuspension + 15 µl A-23187 (200 µM Stammlösung in TALP/DMSO) in einem Eppendorfgefäß gut mischen ($C_{End}^{A23187} = 3 \mu\text{M}$)
- Inkubation des geschlossenen Eppendorfgefäßes im Thermoblock bei 38,5°C für 30 min

Das Ausmaß der Akrosomreaktion vor (frühzeitig) und nach (induziert) Zugabe des Ionophors dient als Maß für die Kapazitation der Spermien. Diese Auswertung kann sowohl mikroskopisch als auch, nach geeigneter Färbung, durchflusszytometrisch erfolgen. Man unterscheidet dabei vier Subpopulationen der Spermien:

- | | |
|--|----------------------|
| a) lebend und morphologisch intaktes Akrosom | leb./NAR |
| b) lebend und defekte oder abgelöste Kopfkappe | leb./akrosomreagiert |
| c) tot und morphologisch intaktes Akrosom | tot/NAR |
| d) tot und defekte oder abgelöste Kopfkappe | tot/akrosomreagiert |

Dieser „Kapazitationstest“ wurde nicht für alle in dieser Arbeit genutzten Spermienproben durchgeführt. Zur Kontrolle und zum Vergleich verschiedener Inkubationsbedingungen wurden einzelne Proben hinsichtlich ihres Akrosomstatus nach Kapazitation und Akrosomreaktion beurteilt.

2.3.3 Zona-pellucida-Bindungsassay

Um die Bindungsfähigkeit der Spermien zu charakterisieren, wurde ein Zona-pellucida-Bindungsassay als „Qualitätstest“ für Eizellen und Säugerspermien entwickelt. Dabei werden kapazitierte Spermienzellen zusammen mit isolierten Zonae inkubiert. Nach dem Waschen der Zonae kann man die fest assoziierten Spermien mikroskopisch beurteilen.

Der an der Tierärztlichen Hochschule Hannover für Eberspermien etablierte Hemizona-Assay und die Arbeiten von Fazeli et al. dienten als Grundlage und wurde an die Fragestellung angepasst [Fazeli et al., 1997; Ferreira, 1998]. Als Ausgangsmaterial wurden Schlachtovarien vom Schwein nach ihrer Entnahme bei -70°C gelagert und am Versuchstag in TALP bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut.

Protokoll – Zona-pellucida-Assay

- mit Hilfe einer Spritze Eizellen aus den Follikeln absaugen und in eine große Petrischale mit TALP überführen
- unter dem Stereomikroskop die Eizellen mehrmals in eine Kapillare aufsaugen, um die Granulosazellen abzulösen
- „saubere“ Eizellen zügig in frische Petrischale mit TALP umsetzen
- unter dem Stereomikroskop die Eizellen mit einer sehr engen Kapillare ansaugen und aufbrechen, um das Zytoplasma und den Zellkern zu entfernen
- leere Zona-pellucida-Hüllen nochmals zügig in frisches TALP überführen und über Nacht im Kühlschrank bzw. bei -20°C lagern
- für Bindungsversuche 2-3 Zonae in ein kleines Zellkulturschälchen mit 50 µl TALP überführen und für 15 min im Zellkulturschrank (5% CO₂) bei 38,5°C inkubieren
- Eberspermien, wie oben beschrieben, in TALP waschen und auf eine Zellkonzentration von 1×10^5 / ml einstellen
- Kapazitation und Markierung der Eberspermien
- 50 µl Spermiesuspension zu den vorbereiteten Zonae hinzugeben
- Inkubation im Zellkulturschrank (5% CO₂) bei 38,5°C für 15 min
- unter dem Stereomikroskop Zonae vorsichtig in eine Kapillare aufsaugen und in 50 µl frisches, vorgewärmtes TALP überführen

Die an den Zonae assoziierten Eberspermien wurden sofort fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

2.3.4 Kavitation

Die Kavitation von Zellen wird seit vielen Jahren zur selektiven Isolierung von Plasmamembranvesikeln genutzt. Dabei werden die Zellen für kurze Zeit einem hohen Gasdruck ausgesetzt. Das Gas, in der Regel Stickstoff, löst sich im Medium und im Zytoplasma der Zellen. Wird schließlich der Druck reduziert, bilden sich kleine Gasblasen, die Löcher in die Zellmembran reißen oder diese völlig ablösen. Gillis et al. isolierten mit dieser Methode erstmals Plasmamembranvesikel von Eberspermien. In den folgenden Jahren wurden die Produkte der Kavitation von Spermien mikroskopisch und biochemisch charakterisiert [Gillis et al., 1978]. Bei geeigneter Wahl der Kavitationsbedingungen wird lediglich die Plasmamembran im Bereich über der Kopfkappe abgelöst, während die äußere

Akrosommembran intakt bleibt [Althouse et al., 1995]. In Anlehnung an die von Peterson et al. beschriebene Methode erfolgte die Kavitation der Eberspermien nach folgendem Protokoll [Peterson et al., 1980].

Protokoll - Kavitation

- Zweimaliges Waschen der flüssigkonservierten Eberspermien in TALP
 - Resuspendieren der Spermien ($\sim 10^9$ Zellen) in 15 ml frischem TALP mit 15 μ l Protease-Cocktail (500 units/ml)
- oder
- Resuspendieren der Spermien ($\sim 10^9$ Zellen) in 15 ml frischem TALP → Kapazitation
→ Zugabe von 15 μ l Protease-Cocktail (500 units/ml) zu den kapazitierten Spermien
 - Kavitation bei 650 PSI (45 bar) für 10 min auf Eis
 - Langsames Ablassen des Überdrucks
 - Lagerung des Kavitates auf Eis

Die Spermien wurden unmittelbar nach der Kavitation markiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

2.3.5 Markierungen

Um Aussagen über die Membranstrukturen der Eberspermien zu erhalten, wurden diese mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und anschließend analysiert. Die verwendeten Marker bauen sich in definierte Zellkompartimente ein oder binden an bestimmte Zellstrukturen und ermöglichen somit eine detaillierte Aussage über die Integrität oder Organisation dieser Zellbestandteile. Tabelle 4 und Abbildung 4 zeigen die verwendeten Marker und ihre Eigenschaften im Überblick.

Kapazitierte Eberspermien reagieren äußerst empfindlich auf jeglichen „Stress“, wie z.B. Temperaturänderung oder Wechsel des Mediums. Deshalb erfolgten alle Manipulationen an den kapazitierten oder akrosomreagierten Spermien ohne Fixierung bei 38,5°C im vorgewärmten TALP (wenn nicht anders beschrieben). Überschüssiger Farbstoff bzw. ungebundener Marker wurden nur ausgewaschen wenn unbedingt nötig. In der Regel reichte die ohnehin nötige Verdünnung der Proben für die Durchflusszytometrie als "Waschschritt" aus.

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Marker und Label: Molekulargewicht (MW) in Dalton (d), Absorptionsmaxima (λ_{abs}), Emissionsmaxima (λ_{em}), Extinktionskoeffizient (ϵ); Desoxyribonukleinsäure (DNS), Plasmamembran (PM), äußere Akrosommembran (äAM).

Marker / Label	Bindung / Einbau	MW [d]	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	$\{\epsilon \times 10^{-3}\}$
Propidiumjodid	DNS	668	535	617	{5,4}
Rhodamin 123	Mitochondrien	381	507	529	{101}
NBD-PS, -PC	PM	860	465	535	{22}
AnnexinV	PS (+Ca ²⁺)	36×10^3	-	-	-
PSA	akrosomaler Inhalt	49×10^3	-	-	-
PNA	äAM	110×10^3	-	-	-
FITC	AnnexinV, PNA, PSA	389	494	518	{75}
Alexa Fluor [®] 594	AnnexinV, PNA	k.A.	590	617	k.A.

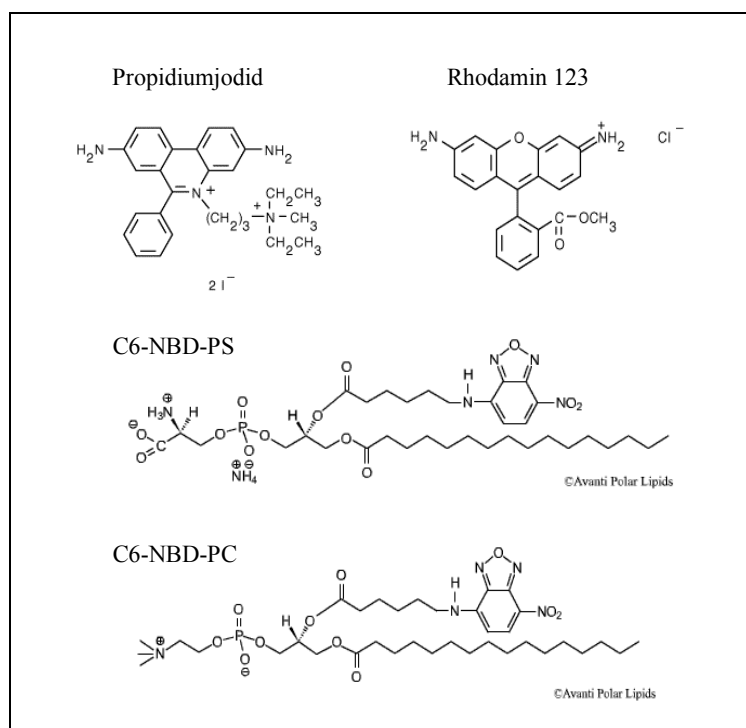


Abb. 4: Strukturformeln verwendeter Fluoreszenzmarker: nach Molecular Probes bzw. Avanti Polar Lipids.

2.3.5.1 Lebend-Tot-Färbung mit Propidiumjodid

Der Farbstoff Propidiumjodid (PI) wird in der Regel von lebenden Zellen ausgeschlossen. Zellen, deren Plasmamembranintegrität gestört ist, erscheinen intensiv rot, da die Fluoreszenzintensität des PI nach Bindung an die Desoxyribonukleinsäure (DNS) auf das 20-30fache steigt. PI baut sich durch Interkalation zwischen den Basenpaaren der DNS im Verhältnis 1 Molekül PI pro 4-5 Basenpaare ein. Für eine konstante Färbung muss PI im Überschuss vorhanden sein, darf aber im Untersuchungszeitraum nicht zytotoxisch wirken.

Protokoll – PI-Färbung

- Aliquot der PI-Stammlösung 1-15 min (Standard: 5 min) vor der Messung direkt in die Messküvette mit 2 ml Spermien suspension (10^5 - 10^6 Zellen; $C_{End}^{PI} = 0,75$ - $1,88 \mu\text{M}$) geben und im Dunkeln weiter inkubieren
- oder
- Aliquot der PI-Stammlösung die letzten 1-15 min (Standard: 5 min) der Inkubationszeit zu 250 μl der zu untersuchenden Spermien suspension (10^5 - 10^6 Zellen; $C_{End}^{PI} = 1,5$ - $15,0 \mu\text{M}$) hinzufügen und im Dunkeln weiter inkubieren

Die Konzentration der Spermien und des PI sowie die Inkubationszeit der Spermien mit dem PI variierten in den einzelnen Versuchen und sind im Ergebnisteil ausgewiesen. Es wurde eine 1,5mM Stammlösung von PI in physiologischer Kochsalzlösung (pNaCl) angesetzt, portioniert und bei 4°C aufbewahrt.

2.3.5.2 Färbung der Mitochondrien mit Rhodamin 123 (R123)

R123 ist ein lipophiles Kation, das in Abhängigkeit vom Mitochondrienmembranpotential in diesem akkumuliert wird. Bricht das Membranpotential der Mitochondrien zusammen, kann der Farbstoff ausgewaschen werden. Für Krebszellen wurde eine carriervermittelte Aufnahme von R123 gezeigt [Cho et al., 2000]. Motile Spermien erscheinen bei dieser Färbung intensiv markiert, während Spermien, deren Mitochondrienmembranpotential Störungen aufweist, eine schwache oder keine Markierung zeigen. Die Färbung der Eberspermien mit R123 erfolgte nach folgender Vorschrift.

Protokoll – Rhodamin-Färbung

- 1 μl einer 0,13 mM (0,05 mg/ml) Stammlösung in Aqua bidest. zu 249 μl der zu untersuchenden Spermien suspension geben (10^5 - 10^6 Zellen; $C_{End}^{R123} = 0,52 \mu\text{M}$)
- Probe für 5-20 min im Dunkeln weiter inkubieren

2.3.5.3 Bindung von Lektinen an akrosomale Zuckerstrukturen

Peanut Agglutinin (PNA) ist ein Lektin, das spezifisch an β -D-Galaktose-Reste bindet. Für Säugerspermien wurde gezeigt, dass es vor allem an der α AM bindet. *Pisum sativum*

Agglutinin (PSA) bindet hingegen spezifisch an α -Methyl-Mannose-Reste, die bei Säugerspermien vor allem an Komponenten des akrosomalen Inhalts (Akrosin) gefunden wurden. Beide Lektine binden nicht an Eberspermien mit intakter Plasmamembran. Eine Markierung mit PNA detektiert man an Spermien deren Integrität der Plasmamembran zerstört ist, deren äußere Akrosommembran aber noch nicht abgelöst ist. Eine PSA-Markierung charakterisiert hingegen ein akrosomreagiertes Spermium. Die Markierung der Eberspermien wurde wie folgt durchgeführt.

Protokoll – Lektinbindung

- 1 μ l einer 0,5 mg/ml Stammlösung in pNaCl zu 249 μ l der zu untersuchenden Spermien suspension geben (10^5 - 10^6 Zellen; $C_{End}^{Lektin} = 2 \mu\text{g/ml}$)
- Probe für 10 min im Dunkeln weiter inkubieren

2.3.5.4 *AnnexinV-Bindung an endogenes Phosphatidylserin*

AnnexinV (AnV) ist ein phospholipidbindendes Protein, das in Anwesenheit von Kalzium mit hoher Affinität an PS bindet. Es wurde in Kombination mit einem Lebend-Tot-Farbstoff als Marker der transversalen Asymmetrie der Phospholipide in der Zellmembran der Eberspermien genutzt. Des weiteren wurde die Verteilung des endogenen PS in der äußere Akrosommembran nach Ablösung der Plasmamembran untersucht. Die Markierung der Spermien erfolgte entsprechend nachstehendem Protokoll.

Protokoll – AnnexinV-Bindung

- 1 μ l einer 250 $\mu\text{g/ml}$ FITC-AnV (Alexa-AnV) Stammlösung zu 249 μ l der zu untersuchenden Spermien suspension dazu geben (10^5 - 10^6 Zellen; $C_{End}^{AnV} = 1 \mu\text{g/ml}$)
- Probe im Dunkeln weiter inkubieren

Sowohl die Temperatur (4°C; RT; 38,5°C) als auch die Dauer der Markierung (1-30 min) mit AnV variierten in den einzelnen Versuchen und sind im Ergebnisteil angegeben.

2.3.5.5 *Einbau und Translokation von fluoreszenzmarkierten Phospholipidanaloga in die Zellmembran der Spermien*

Als zweiten Versuchsansatz zur Untersuchung der transversalen Asymmetrie der

Phospholipide in der Plasmamembran von Eberspermien nutzen wir den spontanen Einbau von fluoreszenzmarkierten Phospholipidanaloga (NBD-PL), deren Fluoreszenz im äußeren Monolayer selektiv gelöscht werden kann. Die zunächst in Methanol/Chloroform (1:1) gelösten NBD-PL wurden im Reagenzglas mit Stickstoff abgedampft und durch Vortexen in Pufferlösung resuspendiert. Die verwendeten NBD-PL sind partiell wasserlöslich und liegen im Monomer-Mizell-Gleichgewicht vor. Nach Zugabe der Spermiesuspension bauen sich die Labelmonomere spontan in die Zellmembran ein. Der Einbau von NBD-PL in die Plasmamembran von Eberspermien wurde zunächst am Fluoreszenzspektrometer verfolgt.

Protokoll – Einbau NBD-PL / Spektrometer

- 1 nmol NBD-PL in 30 µl Medium resuspendieren und Aliquot der NBD-Label in 2 ml TALP in der Messküvette mischen → Nulllinie
- 60 µl Spermiesuspension ($\sim 1 \times 10^7$ Zellen) zugeben → Kinetik des Einbaus der NBD-PL (1-20 % Label/endogenem Plasmamembranphospholipid (mol/mol))
- Zugabe von 20 µl Triton X-100 (1%) → Auflösen der Mizellen → Dequenching

Die Eigenfluoreszenz der Spermien war in den verwendeten Konzentrationen und Messeinstellungen vernachlässigbar. Der Einbau der NBD-PL wurde nur an in TALP gewaschen Spermien bei Raumtemperatur untersucht. Vergleichende Untersuchungen an gewaschenen und kapazitierten Eberspermien erfolgten am Durchflusszytometer, um zwischen membranintakten und -defekten Zellen unterscheiden zu können.

NBD-Lipidderivate fluoreszieren mit hoher Quantenausbeute. Die Zugabe von Dithionit führt zur Reduktion der Nitrogruppe am C4 des konjugierten Ringsystems und somit zum Erlöschen der Fluoreszenz. McIntyre und Sleight etablierten diesen Assay zur Bestimmung der transversalen Lipidverteilung in Membranen [McIntyre and Sleight, 1991]. Unter der Voraussetzung, dass die Dithionitionen nicht die Plasmamembran durchdringen, werden nur die NBD-Gruppen der Analoga in der äußeren Lamelle reduziert. Da die Reduktion um Größenordnungen schneller ist als die transversale Bewegung der NBD-PL über die Membran, kann mit diesem Assay die transversale Phospholipidverteilung in der Plasmamembran von Zellen bestimmt werden [Pomorski et al., 1994]. Zu beachten ist dabei jedoch, dass sowohl der Abbau der Label durch Phospholipasen als auch der innerzelluläre Lipidtransport (z.B. Endozytose) die Ergebnisse verfälschen können. Um die Kapazitation der Eberspermien nicht zu blockieren - die Hydrolyse von Phospholipiden ist hierbei

wahrscheinlich ein wesentlicher Bestandteil - wurde auf die Zugabe von Hemmstoffen (z.B. DFP oder PMSF) verzichtet.

Das molare Verhältnis des Labels zu endogenen Membranphospholipiden wurde so gewählt, dass ein Labelanteil von 2% (mol/mol) nicht überschritten wurde. Dabei wurde für die Eberspermien ein Gesamtphospholipidgehalt von $2 \mu\text{mol}/10^9$ Zellen angenommen (eigene Messungen und Werte für Bullenspermien aus [Parks et al., 1987]). Nach Abschätzungen aus Membranpräparationen von Forellen- und Bullenspermien entfallen 1/3 bis 1/5 auf die Plasmamembranphospholipide. Die Versuche wurden in Anlehnung an bereits beschriebene Protokolle zur Markierung von Spermien mit NBD-PL durchgeführt [Gadella et al., 1999a; Müller et al., 1999].

Protokoll – Einbau und Einwärtstranslokation NBD-PL / Durchflusszytometrie

- 1 nmol NBD-PL in 30 μl Medium resuspendieren
- 60 μl Spermiesuspension ($\sim 1 \times 10^7$ Zellen) zugeben und im Dunkeln inkubieren \rightarrow spontaner Einbau der NBD-PL ($\sim 1\%$ Label/endogenem PM-PL (mol/mol))
- Zugabe von 1 ml Medium \rightarrow Zentrifugation 2 min, $1200 \times g$
- Überstand absaugen (Abtrennen nicht eingebauten Labels)
- Pellet in frischem Medium resuspendieren
- weitere Inkubation im Dunkeln \rightarrow Translokation
- Aliquot für 1. Messung (Gesamtfluoreszenz Innen + Außen) entnehmen, in Messküvette mit 2 ml TALP überführen und mit PI ($1,88 \mu\text{M}$; 2-5 min) färben
- 15.000 Zellen am Durchflusszytometer vermessen
- für die 2. Messung (Fluoreszenz Innen) 20 μl Dithionit (1 M in 1 M Tris, pH 9, $C_{\text{End}}^{\text{Dithionit}} = 10 \text{ mM}$) in die Messküvette pipetieren, gut mischen und 1 min im Dunkeln inkubieren
- 15.000 Zellen am Durchflusszytometer vermessen

Die Zentrifugation und die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Die jeweilige Inkubationstemperatur und -zeit ist im Ergebnisteil ausgewiesen. Um die sehr schnelle Translokation des NBD-PS auf die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran zeitlich besser auflösen zu können, wurde bei einigen Versuchen auf ein Auswaschen der nicht eingebauten

Label verzichtet und die Dauer der PI-Färbung auf 2 min reduziert. Genaue Erläuterungen zur Auswertung der einzelnen Messungen und zu den durchgeführten Berechnungen sind im Ergebnisteil dargestellt.

Um die Translokation der NBD-PL von der zytoplasmatischen zur exoplasmatischen Seite zu analysieren, wurde die Fluoreszenz der NBD-PL im äußeren Monolayer mit Dithionit gelöscht, die Spermien in BSA-haltigem Medium gewaschen und weiter inkubiert.

Protokoll – Auswärtstranslokation NBD-PL / Durchflusszytometrie

- 1 nmol NBD-PL in 30 µl Medium resuspendieren
- 60 µl Spermien suspension ($\sim 1 \times 10^7$ Zellen) zugeben und im Dunkeln inkubieren → spontaner Einbau der NBD-PL ($\sim 1\%$ Label/endogenem PM-PL (mol/mol))
- Zugabe von 1 ml TALP +Dithionit (20 mM) +BSA (6 mg/ml)
- Zentrifugation 2 min, 1200×g → Überstand vorsichtig absaugen
- Pellet in frischem TALP (+BSA) resuspendieren
- weitere Inkubation im Dunkeln → Auswärtstranslokation
- Aliquot in 2 ml gefiltertes TALP-Medium überführen
- Färbung mit PI (1,88 µM; 5 min)
- 15.000 Zellen am Durchflusszytometer vermessen

Auch für diese Versuche sind die genauen Erläuterungen zur Auswertung der einzelnen Messungen und zu den durchgeführten Berechnungen im Ergebnisteil dargestellt.

2.3.6 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektren der verwendeten Label und die Kinetiken des Einbaus der NBD-PL wurden an einem Shimadzu RF 5001 PC Spektrometer aufgenommen. Mit Hilfe eines kleinen Magnetrührers wurden die Spermien und die Fluoreszenzmarker zu einer homogenen Suspension vermischt. Die Messdaten wurden exportiert und mit SigmaPlot bearbeitet.

Die gemessenen Einbaukinetiken wurden nach den Messungen normiert. Unter der Annäherung, dass die Quantenausbeute der NBD-PL in der Spermienmembran vergleichbar ist mit der in Tritonvesikeln, erfolgte die Normierung wie folgt:

$$\text{Labelanteil(innen)} = \frac{(\text{Messwert} - \text{Nullwert}) * 100\%}{\text{Maximalwert} - \text{Nullwert}}$$

Dabei entspricht der Nullwert der gemittelten Fluoreszenzintensität der NBD-PL im Puffer und der Maximalwert der gemittelten Fluoreszenzintensität der NBD-PL in Triton.

Die jeweils verwendeten Geräteeinstellungen für die Anregung und Emission (Wellenlänge, Spaltbreite) sind im Ergebnisteil angegeben.

2.3.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es in kurzer Zeit die Fluoreszenzeigenschaften von mehreren tausend markierten Einzelzellen aufzuzeichnen und zu analysieren. Somit können auch kleine Subpopulationen, die durch eine bestimmte Eigenschaft gekennzeichnet sind, erkannt werden. Die zu untersuchenden Zellen müssen in einer relativ hohen Verdünnung in Suspension vorliegen. Die Einzelzelluntersuchungen gefärbter Eberspermien erfolgten an einem Durchflusszytometer (Particle Analysing System - PAS) der Firma Partec GmbH (Münster, Deutschland). Dieses Gerät ist mit einem Argon-Ionen-Laser (200 mW, 488 nm) ausgestattet und ermöglicht die Analyse des Fluoreszenz- (FL1, FL3) und Streulichts (FSC, SCC) der gemessenen Partikel in folgenden Kanälen.

FL1 (grün): TK500, EM 515-560 // **FL3** (rot): TK610, RG630 // **FSC**: Ex488 // **SCC**: Ex488

Ein Aliquot der zu untersuchenden Spermien suspension wurde in 2ml gefiltertem Messpuffer (in der Regel TALP) gleichmäßig suspendiert und zügig vermessen. Bei einer Messgeschwindigkeit von 100-150 Zellen pro Sekunde wurden in 2 Minuten 15.000 Zellen erfasst.

Die Auswertung erfolgte mit der Software von Partec. Nachdem anhand des Streulichtes die Spermien identifiziert wurden, konnten die Fluoreszenzeigenschaften dieser Zellen in den 1-Parameter-Histogrammen der Einzelkanäle analysiert werden. Es wurden Intensitätsbereiche festgelegt, in denen die Spermien nicht (Ø), schwach (+) oder stark (++) fluoreszierten. Eine Peakanalyse der Histogramme lieferte die arithmetischen Mittelwerte der Intensitätspeaks und die Prozentsätze der im jeweiligen Bereich gemessenen Zellen. Des weiteren wurden bei allen Doppelfärbungen die Fluoreszenzen der gemessenen Spermienzellen gegeneinander in einem 2-Parameter-Diagramm aufgetragen. Dies ermöglichte die Einteilung in Quadranten oder Regionen unterschiedlicher Fluoreszenzeigenschaften (z. B. unmarkiert / nur grün / nur rot / grün und rot).

Für einige Messungen war eine sogenannte Farbkompensierung nötig. Das Emissionsspektrum von R123 und NBD reichte aufgrund ihrer hohen Quantenausbeuten in den Bereich der roten Wellenlängen. Anhand einer Einzelfärbung von Eberspermien mit diesen Markern wurde die jeweilige Kompensierung festgelegt und für die entsprechende Doppelfärbung mit PI (oder Alexa-PNA) übernommen.

2.3.8 Mikroskopie

Vor jedem Versuchstag erfolgte eine Einschätzung der flüssigkonservierten Eberspermien im Phasenkontrast (Jenaval, Carl Zeiss Jena). Für die Motilitätsbeurteilung der Spermien (250fache Vergrößerung) werden drei Bewegungsformen (vorwärtsbeweglich, ortsbeweglich, unbeweglich) unterschieden. Bei der morphologischen Differenzierung der Eberspermien (800fache Vergrößerung) werden verschiedene Veränderungen des Kopfes, der Kopfkappe, des Halses und des Spermischwanzes unterschieden. Zwei wesentliche Subpopulationen wurden für alle in den Versuchen eingesetzten Ejakulate erfasst: Der Anteil morphologisch intakter Zellen, die durch einen sich deutlich abzeichnenden „normalen akrosomalen Rand“ (NAR) und eine unveränderte Schwanzform gekennzeichnet sind, und der Anteil an Spermien, mit denen Zytoplasmatropfen assoziiert waren. Die Spermienkonzentration wurde, wenn erforderlich, mit Hilfe einer Zählkammer (Bürker-Thürk) bestimmt und entsprechend eingestellt. Dazu wurde die Motilität der Eberspermien in einer hypertonen Kochsalzlösung blockiert. Die Beurteilung der Hyperaktivierung, Agglutination und des Akrosomstatus nach Kapazitation und Akrosomreaktion erfolgte für ausgewählte Proben ebenfalls an einem Lichtmikroskop unter Phasenkontrast-Optik (Jenaval, Carl Zeiss Jena).

2.3.8.1 *Fluoreszenzmikroskopie*

Die mikroskopische Beurteilung fluoreszenzmarkierter Eberspermien erfolgte entweder an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Axiovert 100) oder an einem Olympus-IX81. Dazu wurde eine Aliquot der markierten Spermien unverdünnt auf einen vorgewärmten Objektträger gebracht und mit einem warmen Deckgläschen (20×30) abgedeckt. Beide Mikroskope sind mit einem Wärmetisch ausgestattet, so dass die Proben (wenn nicht anders angegeben) bei 38,5°C untersucht werden konnten. Die Morphologie der Spermien wurde unter Phasenkontrast-Optik (Zeiss) oder im differentiellen Interferenzkontrast (Olympus) beurteilt. Für die Aufnahme von monochromatischen Bildern sind beide Mikroskope mit einer Digitalkamera ausgerüstet.

- Standardfilter (Zeiss): Ex BP 450-490, Em LP 520; Ex BP 546/12, Em LP 590
- Kamera (Zeiss): Photometrics Cool SNAP fx™ (Visitron Systems GmbH)
- Standardfilter (Olympus): NIBA BP 470-490, BA 515-550, DM 505; NG BP 530-550, BA 590, DM 570
- Kamera (Olympus): Spot RT (Diagnostic Instruments, inc., Sterling Heights, USA)

Die Bildauswertung erfolgte mit der Software MetaVue der Firma Universal Imaging Corp. (Las Vegas, USA), die eine Überlagerung einzelner Fluoreszenzbilder ermöglicht.

2.3.8.2 *Elektronenmikroskopie*

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten am Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW) in Berlin. Die fixierten Proben wurden entsprechend der unten aufgeführten Protokolle, für die Elektronenmikroskopie aufgearbeitet. Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultracut Ultramikrotom der Firma Reichert-Jung (Iowa City, USA) angefertigt und die fertigen Präparate an einem Elektronenmikroskop TEM Zeiss 902A der Firma Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland) untersucht. Proben kapazitierter und kavittierter Eberspermien wurden elektronenmikroskopisch zunächst bezüglich ihrer Membranstruktur untersucht (Protokoll I).

Protokoll – Elektronenmikroskopie I

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">- Fixierung der Spermien in 2,5%igem Glutaraldehyd- Lagerung der Proben im Kühlschrank- Waschen der fixierten Proben in PBS (nach Sörensen, pH 7,2)- Nachfixierung der Lipide mit 2%igem Osmiumtetroxid- Dehydrieren in aufsteigender Ethanolreihe- Einbetten in EPON 812- Ultradünnschnitte kontrastieren mit Uranylacetat und Bleicitrat |
|--|

Weitere Versuche zur Analyse von an Spermien gebundenem AnV mit Hilfe eines goldmarkierten Antikörpers erfolgten in Anlehnung an bestehende elektronenmikroskopische Arbeiten nach Protokoll II [Nagae et al., 1986; Pellicciari et al., 1997; Szöllösi and Hunter, 1978; Töpfer-Petersen et al., 1983].

Die Fixierung der kapazitierten Spermien erfolgte die ersten 30 min bei 38,5°C mit anschließender Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur. Bei den Proben kavittierter Spermien erfolgte die Markierung mit Biotin-AnV und die Fixierung auf Eis.

Protokoll – Elektronenmikroskopie II

Markierung der Eberspermien mit Biotin-gelabeltem AnV:

- 50 µl AnV-Biotin zu 5 ml der zu untersuchenden Spermiesuspension ($\sim 10^8$ Zellen, $C_{End}^{AnV} = 1 \mu\text{g/ml}$) dazugeben und für 10 min weiter inkubieren

Fixierung der Spermien:

- Zugabe von 5ml temperiertem Immunkarnovsky (+2mM CaCl_2 !!!) und Inkubation der Spermiesuspension für weitere 30 min
- Zentrifugation 5 min, 1200×g (langsames Beschleunigen und Abbremsen!)
- Überstand vorsichtig absaugen und Pellet in frischem Immunkarnovsky (+2mM CaCl_2 !!!) resuspendieren
- Lagerung der Proben im Kühlschrank

Einbettung, Ultradünnschnitte und Kontrastierung:

- Waschen der fixierten Proben in PBS (nach Sörensen, pH 7,2)
- Dehydrieren in aufsteigender Ethanolreihe
- Einbetten in LR-White
- Ultradünnschnitte für 30 min (RT) mit Anti-Biotin-Antikörper (1:5) inkubieren
- Kontrastieren der Schnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat

Bei allen Versuchsansätzen wurde je ein Aliquot der Spermiesuspension ohne Biotin-AnV präpariert, um unspezifische Bindung des Anti-Biotin-Antikörpers analysieren zu können.

2.4 Forellenspermien

Forellenspermien dienten als Untersuchungsobjekt für die laterale Phasenseparation von Lipiden und Proteinen, da sie einen einfacheren Zellaufbau als Eberspermien aufweisen. Reife Forellenspermien besitzen kein Akrosom und nur ein einzelnes ringförmiges Mitochondrium. Die Versuche an Forellenspermien wurden im Rahmen eines PROCOPE-Austauschprogrammes in Zusammenarbeit mit dem „Laboratoire de Ichtyodiversite et Cryoconservation“, Rennes, Frankreich (C. Labbé) durchgeführt. Für alle Versuche wurden ausgewachsene Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) aus Aquakulturen genutzt. Die Spermien wurden innerhalb der Fortpflanzungssaison nach Anästhesie der Forelle mit Phenoxy-2-ethanol gewonnen. Dazu wurden die Flanken der Tiere ausgestrichen und die Spermien in einem Falcon-Röhrchen mit 10 ml Pufferlösung aufgefangen. Als Wasch- und

Inkubationsmedium wurde SFMM (Seminal fluid mineral medium, [Billard, 1983]) verwendet (110 mM NaCl; 28,3 mM KCl; 1,1 mM MgSO₄; 1,8 mM CaCl₂; 20 mM TRIS, pH 9). In diesem Medium bleiben die Forellenspermien im immobilen Zustand und können bei 4°C unter Sauerstoffbegasung gelagert werden. Die Motilität der Spermien wurde am Mikroskop eingeschätzt. Dazu wurden 20 µl eines Aktivierungsmediums (enthält kein KCl) mit 2 µl der Forellenspermien direkt auf einem Objektträger vermischt. Dies bewirkt einen Kaliumstrom aus der Zelle und daran gekoppelt einen Kalziumeinstrom in das Spermium [Tanimoto and Morisawa, 1988]. Über mehrere Zwischenschritte erfolgt sehr schnell die Aktivierung der Forellenspermien, verbunden mit einer sehr intensiven Bewegung, die jedoch innerhalb 1 min wieder erlischt. Zur weiteren Versuchsführung wurden die Spermien zunächst bei 250×g für 25 min bei 10°C zentrifugiert und das Spermienpellet 1:1 (vol/vol) in frischem SFMM resuspendiert ($\sim 1 \times 10^{10}$ Spermien/ml). Die gewaschenen Forellenspermien wurden in einem verschlossenen, liegenden, abgedunkeltem Falcon-Röhrchen auf Eis gelagert, um eine möglichst große Oberfläche dem Luftsauerstoff zugänglich zu machen.

2.4.1 Isolation von Triton-unlöslichen Membranfraktionen

Protokoll – Raft-Isolierung

- Spermiesuspension 1:1 (vol/vol) mit Lysepuffer (SFMM + 2% Triton) durch vortexen gut vermischen
- Lyse der Forellenspermien in 1%igem Triton für 20 min auf Eis
- Homogenisieren der Zelltrümmer durch 10maliges Pottern auf Eis
- Trennung der Membranvesikel (Überstand) von der DNS und anderen schweren Zelltrümmern (Pellet) durch Zentrifugation (5 min, 1300×g, 4°C)
- Saccharosegradienten (4 ml - 30%, 4 ml - 20%, 4 ml - 15%, 4 ml - 10%, 3 ml - 5%, 3 ml - 0%) in ein Ultrazentrifugenröhrchen ($V_{\text{gesamt}}=37$ ml) schichten
- 7,5 ml des Überstandes werden 1:1 (vol/vol) mit 80%iger Saccharoselösung vermischt und dem Gradienten unterschichtet
- Ultrazentrifugation für 18 h bei 28000 rpm, 4°C im Swing-out Rotor (mittlere Beschleunigung 100.000×g)
- Absammeln aller sichtbaren Banden im Gradienten mit Hilfe einer Spritze und genaue Bestimmung des Volumens.

Die Versuche wurden in Anlehnung an ein Protokoll zur Isolierung Triton-unlöslicher Membranfraktionen aus Krebszellen durchgeführt [Yamamura et al., 1997]. Abweichungen von diesem Protokoll werden im Ergebnisteil gesondert ausgewiesen. Variiert wurden die Triton- und Kalziumkonzentrationen des Lysepuffers, die Inkubationsdauer der Spermien im Lysepuffer und die Ultrazentrifugationsdauer. In Abbildung 5 sind die Präparationsschritte gekennzeichnet an denen Proben zur Lipid- und Proteinbestimmung entnommen wurden.

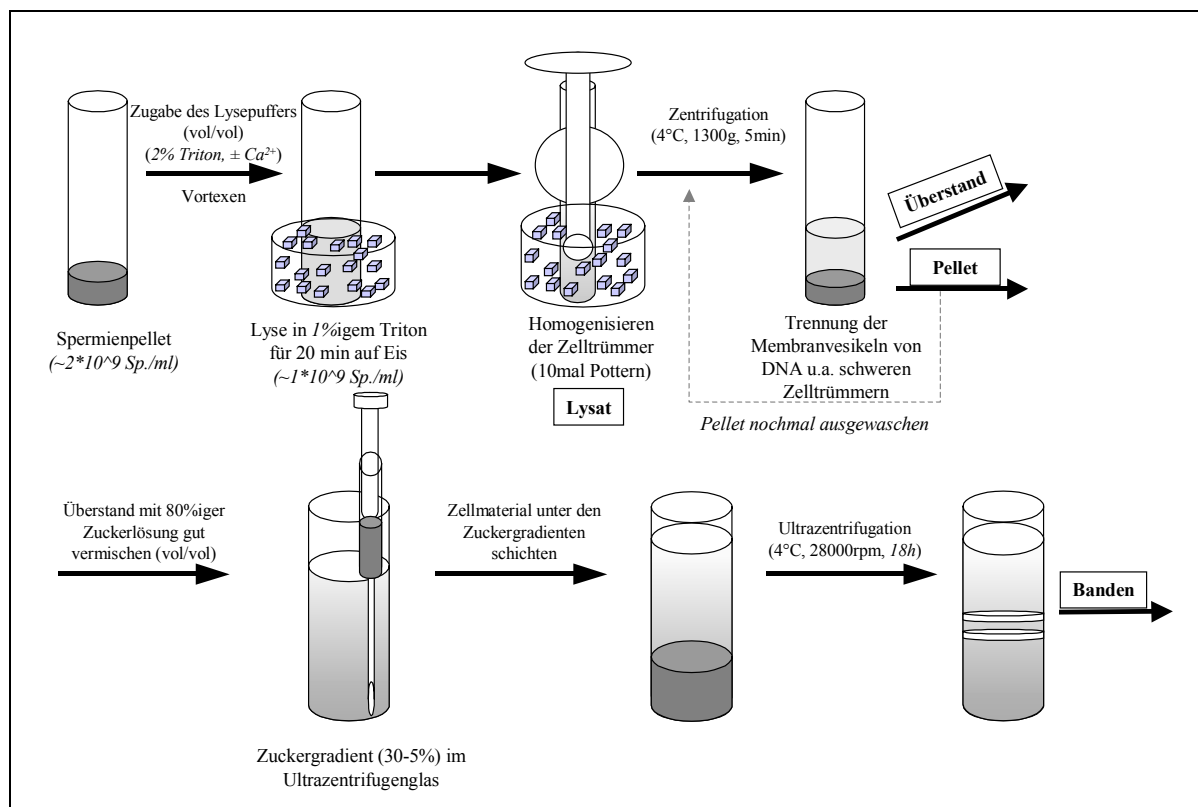


Abb. 5: Raftpräparation aus Spermienzellen: Isolierung von in Triton unlöslichen Membranfraktionen, die sich durch eine geringere Dichte auszeichnen und somit im Dichtegradienten aufsteigen. Kursiv geschriebene Angaben wurden variiert und sind im Ergebnisteil angegeben.

2.4.2 Lipid- und Proteinanalysen

Die zu analysierenden Proben wurden bei -70°C gelagert. Für alle selektierten Banden sowie für das Ausgangslysat, den Überstand der Membranvesikel, der dem Gradienten unterschichtet wurde, und das jeweils verbleibende Pellet wurde eine quantitative Bestimmung des CHO-, PL- und Proteingehaltes durchgeführt.

2.4.2.1 *Lipidextraktion*

Die Extraktion der Lipide erfolgte nach einer 2-Schritt-Methode [Bligh and Dyer, 1959]. Prinzipiell werden die Lipide von den Proteinen und der DNS durch Phasenseparation (Chloroform / Methanol+Wasser) getrennt. Ein Teil der Glykolipide und der geladenen Phospholipide (z.B. PS) verbleibt dabei jedoch in der wässrigen Phase und geht für die Lipidbestimmung verloren. Eine Zugabe von Essigsäure würde aber die in Spermienzellen zahlreich vertretenen Plasmalogene angreifen und eventuell zerstören.

2.4.2.2 *Phosphatbestimmung*

Der Anteil an Phospholipiden in den Proben wird aus der Menge an Phosphat in einem Aliquot der extrahierten Lipide bestimmt. Dazu wird das vorhandene Phosphat mit Perchlorsäure hydrolysiert. Die freien Phosphationen zeigen nach Zugabe von Heptaammoniummolybdat und Ascorbinsäure eine konzentrationsabhängige Farbreaktion, die mit Hilfe eines Phosphatstandards kolorimetrisch quantifiziert werden kann.

2.4.2.3 *Cholesterolbestimmung*

Der Cholesterolanteil wurde mit einem KIT (Boehringer Mannheim Nr.: 1442341) in einem Aliquot der extrahierten Lipide bestimmt. Der Assay beruht auf einer enzymatischen Reaktionskette, in der das Cholesterol stöchiometrisch umgesetzt und die Reaktionsprodukte kolorimetrisch analysiert werden.

2.4.2.4 *Proteinbestimmung*

Der Proteingehalt in den Proben wurde mit einem BCA Protein Essay (Biuret-Reaktion) von Pierce (Nr.: 23225) bestimmt. Das Reaktionsprinzip beruht auf der charakteristischen Reduktion von Kupferionen ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$) durch die Peptidbindungen der Proteine im alkalischen Milieu. Die entstehenden Cu^{1+} -Ionen werden kolorimetrisch analysiert.

Die kolorimetrischen Analysen erfolgten jeweils mit Hilfe eines ELISA-Platten-Lesegerätes. Für jeden Versuchsansatz wurden Standardkonzentrationsreihen zur Eichung des Gerätes mitgeführt.

2.5 **Berechnungen und Statistik**

Alle Berechnungen und statistischen Analysen erfolgten entweder in Excel oder in SigmaPlot. Es sind entweder die Ergebnisse von Einzelversuchen angegeben oder Mittelwert und Standardabweichung einer Versuchsgruppe. Die Berechnung von Signifikanzen erfolgte mittels t-Test oder, bei gepaarten Versuchen, mit Hilfe des gepaarten t-Tests.

3 Ergebnisse

3.1 Vorbereitende Versuche zur Markierung von Eberspermien mit Fluoreszenzlabeln

3.1.1 Lebend-Tot-Färbung mit Propidiumjodid

Eine Suspension von Spermienzellen enthält immer einen gewissen Anteil toter Zellen, der im Laufe der Inkubation z.T. erheblich ansteigen kann. Um Membranänderungen an intakten Zellen analysieren zu können, ist eine Lebend-Tot-Färbung unerlässlich. PI fluoresziert im Bereich roter Wellenlängen (617nm) und wird häufig zur Identifizierung toter Zellen genutzt, da es eine Gegenfärbung mit zahlreichen Fluoreszenzmarkern (NBD, R123, FITC) ermöglicht. Der geringe Extinktionskoeffizient des PI machte eine hohe Verstärkung der roten Fluoreszenzsignale nötig. Messungen PI-gefärbter Eberspermien am Durchflusszytometer ergaben drei Populationen (PI Ø, PI+, PI++) zunehmender Fluoreszenzintensität.

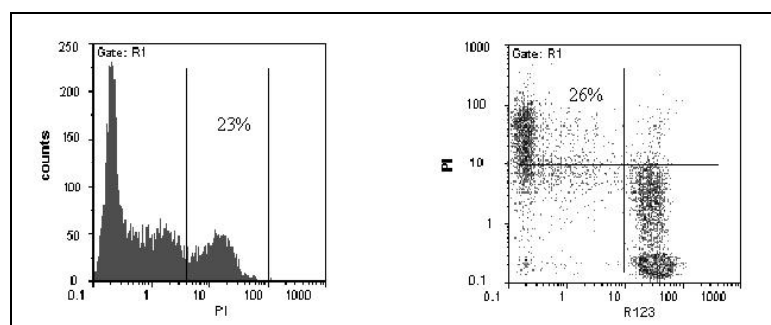


Abb. 6: Durchflusszytometrische Erfassung von kapazitierten Eberspermien nach Markierung mit PI und R123. Das Histogramm zeigt das Ergebnisse der Einzelfärbungen mit PI, das 2-Parameter-Diagramm die Auswertung der Doppelfärbung (1µl R123 20min bei RT inkubiert und ausgewaschen, 2,5µl PI in Küvette 5min vor Messung).

Um entscheiden zu können, ob die mittlere Population (PI+) Zellen kennzeichnet, deren Membranintegrität gestört war oder ob es sich um eine unspezifische Wechselwirkung des PI mit den Spermien handelte, erfolgte eine Gegenfärbung mit R123, einem Mitochondrien-Farbstoff. Die Motilität der Spermien muss bis zur Befruchtung erhalten bleiben und ist unmittelbar von der Mitochondrienfunktion abhängig. Doppelfärbungen der Eberspermien mit R123 und PI zeigten deutlich (Abb. 6), dass nur die stark PI-gefärbten Zellen (PI++) toten, nicht motilen (R123Ø) Spermien entsprachen. Die Bedeutung der schwach gefärbten PI-Populationen blieb unklar. Wurde R123 nach der Färbung nicht ausgewaschen, sondern nur durch Überführen der markierten Spermiesuspension in die Messküvette verdünnt, erschienen alle defekten Zellen schwach R123 gefärbt.

3.1.1.1 Optimierung der PI-Färbung für kapazitierte Spermien

Die Konzentration des PI wurde so niedrig gewählt, dass (i) keine Fixierung der Spermien nötig war und (ii) PI im Untersuchungszeitraum nicht zytotoxisch wirkte. Andererseits musste die PI-Konzentration hoch genug sein, um (iii) eine Trennung der Subpopulationen im Durchflusszytometer auch bei Messungen in großer Verdünnung sicher zu ermöglichen und (iv) eine Sättigung der Bindung zu erreichen (1PI-Molekül pro 4-5bp).

Da die Versuche zur Lipidorganisation vor allem an kapazitierten Eberspermien durchgeführt werden sollten, wurde zunächst die PI-Färbung für kapazitierte Spermien optimiert. Dazu wurde eine Spermienprobe kapazitiert und Aliquots zur PI-Färbung entnommen.

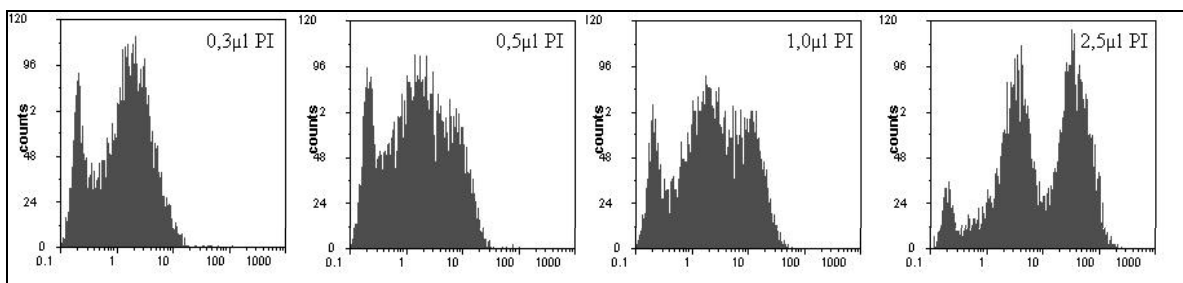


Abb. 7: PI-Färbung von kapazitierten Eberspermien: Aufspaltung der vom Durchflusszytometer aufgezeichneten Fluoreszenzpeaks in Abhängigkeit von der eingesetzten PI-Konzentration. Die Markierung der Spermien erfolgte direkt in der Messküvette für 5min bei 38,5°C. Die jeweilige PI-Konzentration und molare PI-Menge pro Zelle ist in Tabelle 1 angegeben.

Abbildung 7 zeigt an einem Beispiel die Verschiebung der Fluoreszenzpeaks in Abhängigkeit von der eingesetzten PI-Konzentration. Beim Färben der Eberspermien in der Messküvette war eine Abgrenzung der toten Zellen erst ab einer Konzentration von 0,75µM PI (1µl PI/2ml Puffer) möglich. Eine bessere Trennung der PI-Peaks erhält man mit 1,88µM PI (2,5µl/2ml Puffer), wobei dann der Anteil „toter“ Spermien bereits zunimmt.

In Tabelle 5 sind die verwendeten PI-Konzentrationen während der Markierungen und Messungen im Überblick dargestellt. Bei einem angenommenen mittleren DNS-Gehalt von 3µg/10⁶ Eberspermien [Anand et al., 1967] und einem mittlerem Molekulargewicht von 600 g/mol und Basenpaare ergibt sich ein Gehalt von ca. 5 nmol Basenpaare/10⁶ Spermienzellen. Eine Sättigung der gesamten DNS mit PI erfordert somit ca. 1nmol PI / 10⁶ Zellen.

Alternativ zur Markierung in der Messküvette erfolgte die PI-Färbung im Eppendorfgefäß. Die molare PI-Menge pro Spermium entsprach den Werten der Markierung in der Messküvette (Tab. 5). Lediglich das Volumen und somit die Konzentration der Spermien und des PI während der Färbung waren im Vergleich zur Messküvette erhöht.

Tab. 5: PI-Färbung von Eberspermien: Überblick über die zur Lebend-Tot-Färbung von Eberspermien getesteten PI-Konzentrationen. Die Zellzahl pro Färbungsansatz betrug ca. $1 \cdot 10^6$ Zellen.

Volumen der zugesetzten 1,5mM PI-Stammlösung [μ l]	PI-Konzentration [μ M] bei Markierung im Eppendorfgefäß à 250 μ l	PI-Konzentration [μ M] bei Markierung/Messung in Küvette à 2ml	PI-Konzentration / Anzahl der Zellen [nmol PI / 10^6 Spermien]
0,3	1,8	0,23	0,45
0,5	3,0	0,38	0,75
1,0	6,0	0,75	1,50
2,5	15,0	1,88	3,75

Abbildung 8 zeigt den Einfluss der Konzentrationsverhältnisse sowie den Einfluss der Abkühlung der Probe ($38,5^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$) während der PI-Färbung.

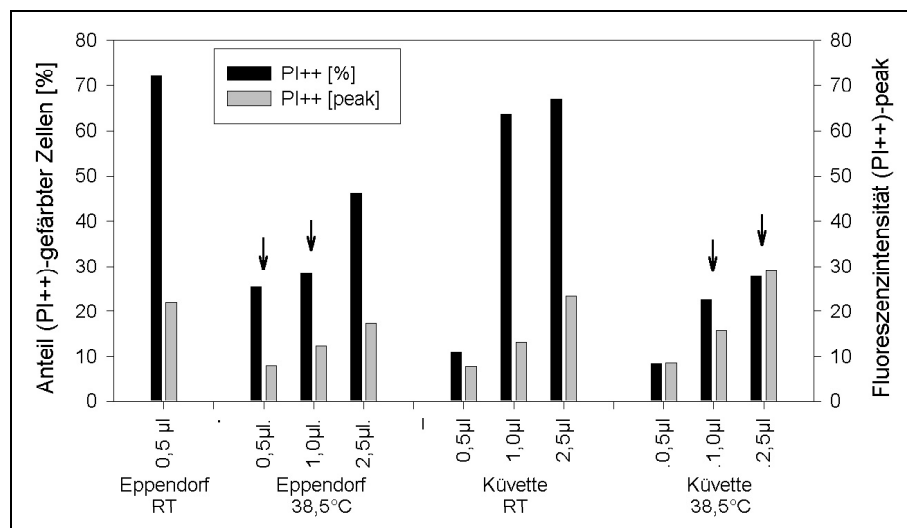


Abb. 8: PI-Färbung von kapazitierten Eberspermien: Einfluss der Inkubationsbedingungen (Konzentration und Temperatur) während der PI-Färbung kapazitierter Eberspermien auf den Anteil (PI++)-gefärbter Zellen und auf die Fluoreszenzintensität des (PI++)-Peaks. Die PI-Konzentration und molare PI-Menge pro Zelle sind in Tabelle 1 angegeben. Die Spermien wurden jeweils 5min mit PI inkubiert und anschließend zügig am Durchflusszytometer gemessen. Die mit einem Pfeil markierten Säulen kennzeichnen die Versuchsbedingungen, bei denen eine deutliche Trennung der PI-Peaks erreicht wurde, ohne das der Anteil (PI++)-gefärbter Zellen massiv anstieg.

Als repräsentatives Beispiel sind die Ergebnisse eines Versuchstages dargestellt. Der Versuch wurde dreimal wiederholt. Die jeweiligen Resultate zeigten immer die gleiche Tendenz. Aufgrund der großen Streuung in der Lebensfähigkeit der Spermien nach Kapazitation wurden die Ergebnisse nicht gemittelt. Bei der Markierung kapazitierter Eberspermien im Eppendorfgefäß kann man mit deutlich geringeren Mengen an PI (nmol PI/Spermium) nach 5min Inkubation eine deutliche Trennung der PI-Peaks erhalten. Entscheidend für eine schnelle Farbstoffpenetration in permeable Zellen ist offensichtlich die höhere Konzentration von PI und Zellen im Volumen.

Wurden die zunächst im Eppendorfgefäß PI-gefärbten Spermien in die Messküvette mit vorgewärmten Puffer überführt und mehrere Minuten stehen gelassen, wurde ein Teil des Farbstoffes wieder ausgewaschen (Ergebnisse nicht gezeigt). Bei geringer PI-Konzentration ($0,3\mu\text{l PI/Eppendorfgefäß} \rightarrow 1,8\mu\text{M PI} + 2\text{ml Messpuffer} \rightarrow 0,23\mu\text{M PI}$) konnte dann der Anteil toter Spermien in der Probe nicht mehr sicher bestimmt werden. Besonders bei Mehrfachmarkierungen war es deshalb wichtig, die PI-Konzentration nicht zu niedrig zu wählen und die Proben nach der PI-Färbung zügig am Durchflusszytometer zu vermessen.

Ein Abfall der Temperatur von $38,5^{\circ}\text{C}$ auf Raumtemperatur sollte während der PI-Färbung von kapazitierten Eberspermien unbedingt vermieden werden. Wurden die Spermien hingegen erst auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend in der Messküvette 5min mit PI markiert, war der Anteil toter Zellen nicht massiv erhöht (Ergebnisse nicht gezeigt). Da kapazitationsbedingte Prozesse teilweise reversibel sind und eine reversible Umverteilung der Phospholipide in der Plasmamembran allein durch ein Absenken der Temperatur nicht ausgeschlossen werden kann, wurden alle Inkubationen möglichst bei $38,5^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

In Abbildung 9 ist die Kinetik der PI-Färbung von kapazitierten Eberspermien dargestellt. Der Anteil toter Spermienzellen erreichte nach ca. 10 min bei allen getesteten PI-Konzentrationen ein Plateau, das im Versuchszeitraum von 30 min relativ konstant blieb. Somit definiert die PI-Färbung auch für kapazitierte, nicht fixierte Spermien eine stabile Population plasmamembranintakter Zellen. Die relativ große Standardabweichung in diesen Kurven macht deutlich, wie hoch die Variabilität der untersuchten Proben hinsichtlich der Lebensfähigkeit kapazitierter Eberspermien war, obwohl für die Versuche nur Spermienproben guter Morphologie (75-83% morphologisch intakte Spermien) und hoher Motilität (70-80%) verwendet wurden.

Für die nachfolgenden Versuche wurde die Lebend-Tot-Färbung von Eberspermien mit PI entsprechend der oben erläuterten Ergebnisse durchgeführt. Die Markierung erfolgte entweder

im Eppendorfgefäß mit 3/6 μM PI oder direkt in der Messküvette mit 0,75/1,88 μM PI für 5 min bei 38,5°C (wenn nicht anders ausgewiesen).

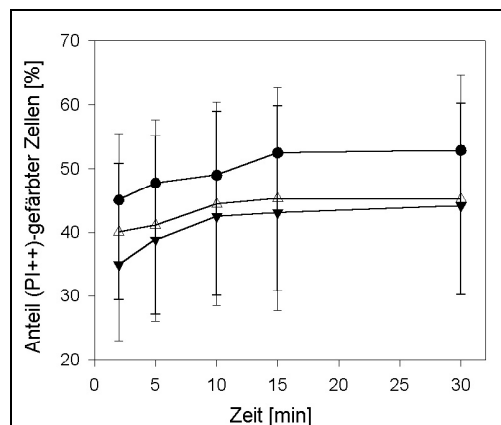


Abb. 9: Zeitabhängigkeit der PI-Färbung kapazitierter Eberspermien: Die Markierung der Spermien erfolgte im Eppendorfgefäß bei 38,5°C. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 Spermienproben, die an einem Tag untersucht wurden (▼ 0,5 μl PI; Δ 1,0 μl PI; ● 2,5 μl PI).

Innerhalb einer Versuchsreihe wurden grundsätzlich alle Proben mit der gleichen PI-Konzentration gefärbt, um die einzelnen Ergebnisse miteinander vergleichen zu können. Für Proben, die eine Doppelmarkierung mit NBD-PL zum Ziel hatten, wurde immer die höhere PI-Konzentration gewählt.

3.1.2 Einbau NBD-markierter Phospholipide in die Plasmamembran

Der Einbau der fluoreszenzmarkierten PL-Analoga in die Zellmembran der Eberspermien wurde zunächst am Fluoreszenzspektrometer verfolgt. Mit diesen Messungen war eine hohe zeitliche Auflösung gerade im Anfangsbereich der Einbaukinetik möglich. Sie stellen allerdings immer nur Mittelwerte über alle Zellen der untersuchten Spermien suspension dar. Die Untersuchungen an kapazitierten Proben, die immer einen relativ hohen Anteil toter Zellen enthalten, wurden deshalb ausschließlich am Durchflusszytometer durchgeführt.

Am Beispiel des NBD-PS ist in Abbildung 10 der konzentrationsabhängige Einbau des Labels in die Zellmembran von Eberspermien dargestellt. Die eingesetzte Menge des NBD-Labels entsprach in den Varianten a, b, c, d ca. 5/10/15/20% der endogenen Phospholipide der Plasmamembran. Im Experiment wurden die ersten 60 sec die Fluoreszenzintensität des NBD-PS im Puffer aufgezeichnet. Nach der Zugabe von Spermien in die Messküvette erfolgte der Einbau der Label in die Plasmamembran der Zellen bei allen untersuchten

Konzentrationen mit einer sehr schnellen Anfangskinetik. In der Variante a erreichte die Fluoreszenzintensität nach ca. 1 min ein Plateau, während in den Varianten b, c, d ein biphasischer Anstieg über die gesamte Messzeit (7 min) beobachtet wurde. Nach Zugabe von Triton (1%) zu den markierten Spermien stieg die Fluoreszenzintensität bei diesen Varianten sprunghaft auf einen Plateauwert an. Die NBD-PL-Mizellen, in denen es zum Quenching der NBD-Fluoreszenz kam, sowie nicht eingebaute NBD-Monomere aus der wässrigen Phase wurden in Triton solubilisiert und zeigten nun eine hohe Quantenausbeute. Bei einer Labelmenge von ca. 5% der endogenen Membranphospholipide (Kurve a), erfolgte der Einbau der Phospholipidanaloga in die Plasmamembran vollständig, da es auch nach Tritonzugabe zu keinem weiteren Fluoreszenzanstieg kam. Die Quantenausbeute des Labels war in Triton somit unverändert zu jener in der Spermienmembran.

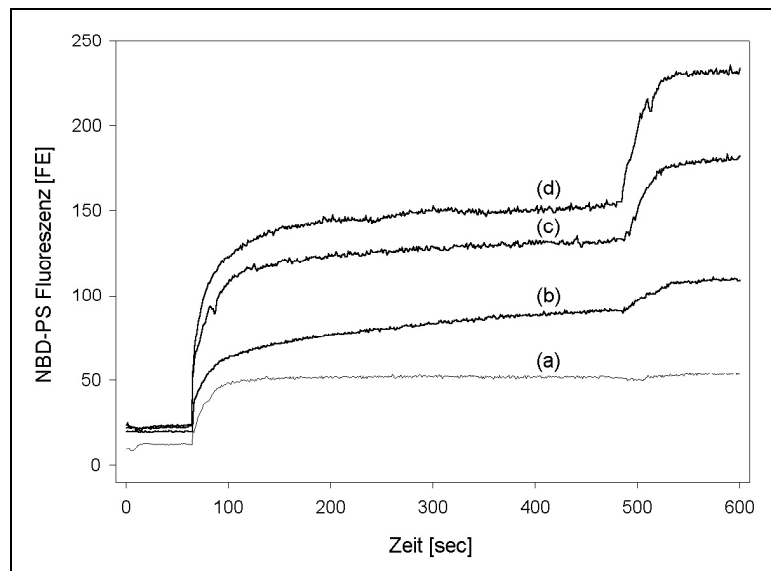


Abb. 10: Kinetiken des Einbaus von NBD-PS in die Zellmembran von Eberspermien: Bei gleichbleibender Spermienkonzentration ($\sim 5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) wurde die Konzentration des NBD-Labels variiert (a) $0,12 \mu\text{M}$, (b) $0,24 \mu\text{M}$, (c) $0,36 \mu\text{M}$, (d) $0,48 \mu\text{M}$ und dessen Einbau verfolgt. Die letzten 120 sec zeigt die Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Triton (1%).

Entsprechend den Erläuterungen im Methodikteil (2.3.6. Fluoreszenzspektroskopie, S.44f) wurden die Kinetiken in SigmaPlot normiert (Kurven nicht gezeigt). Die Einbaukinetik der Variante a konnte sehr gut durch eine monoexponentielle Funktion mit einer Halbwertszeit von 8,8 sec angepasst werden. Die Kinetiken b, c, d konnten nicht monoexponentiell angepasst werden, mehrere Prozesse überlagern sich. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei zum einen um den Einbau der NBD-Monomere in die äußere Lamelle der Plasmamembran,

zum zweiten um die Einwärtstranslokation des NBD-PS auf die zytoplasmatische Seite. Eine einfache Überlagerung zweier exponentieller Funktionen ergab eine gute Anpassung an die Messkurve b mit Halbwertszeiten von 8,8 sec und 4,8 min. Letztere Halbwertszeit stimmt in der Größenordnung gut mit bereits veröffentlichten Translokationszeiten für NBD-PS in Säugerspermien bei Raumtemperatur überein: Bulle $t_{1/2}$ = 1,8 min; Schafbock $t_{1/2}$ ca. 3 min; Eber $t_{1/2}$ = 7,5 min [Gadella et al., 1999b; Müller et al., 1994b; Nolan et al., 1995]. Für die Varianten c und d war auch die Überlagerung zweier Exponentialfunktionen nicht ausreichend, die Anfangskinetik des Labeleinbaus konnte aber auch bei diesen Kurven mit einer Halbwertszeit von ca. 9 sec gut angepasst werden. Welche Prozesse sich bei diesen Messungen überlagerten, konnte nicht im Detail geklärt werden. Ein Quenching der NBD-Fluoreszenz benachbarter Label in der Membran ist wahrscheinlich.

Für alle folgenden Messungen am Durchflusszytometer wurde die Menge der verwendeten NBD-PL so eingestellt, dass ein Labelanteil von 2% der endogenen Membranphospholipide nicht überschritten wurde. Trotzdem kam es bei allen Experimenten zu einem Fluoreszenzanstieg der Spermien während der Inkubationszeiten. Ein Dequenchingeffekt aufgrund zu hoher Labelkonzentration ist nach den oben beschriebenen Versuchen am Photometer unwahrscheinlich. Die Intensität der Markierung der Spermien nahm auch nach dem Waschen der markierten Zellen weiter zu. Dies könnte einerseits durch den Verbleib nicht eingebauter Label in Interzellularräumen erklärt werden, aber auch eine Zentrifugation der markierten Spermien über einen Percollgradienten änderte an diesem Fluoreszenzanstieg nichts. Ein Teil der Label könnte mit der Plasmamembran der Spermien assoziiert sein, sich aber erst allmählich einbauen und/oder homogen über diese verteilen.

Abbildung 11 zeigt die Kinetik des Einbaus der NBD-PL in gewaschene (a, c) und in kapazitierte (b, d) Eberspermien im Vergleich. Auf ein Auswaschen nicht eingebauter Label wurde verzichtet. Die PI-Färbung (1,88 μ M) erfolgte für jedes Aliquot direkt vor der Messung in der Messküvette für 2 min. NBD-PS (a, b; n=5) wurde sowohl in lebende (offene Symbole) als auch in tote (gefüllte Symbole) Spermien sehr schnell eingebaut, wobei (PI++)-Spermien zunächst deutlich mehr Label pro Zeit aufnahmen als (PI-)-Zellen.

Nach 15-20 min erreichte die Fluoreszenzintensität der toten, NBD-PS markierten Zellen ein Maximum bzw. Plateau, während in lebenden Zellen bei allen Versuchen ein kontinuierlicher Fluoreszenzanstieg beobachtet wurde. Dieser Anstieg könnte mit dem Transport des Labels auf die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran einhergehen. Nach einer Markierungsdauer von einer Stunde waren die NBD-Fluoreszenzintensitäten lebender und

toter Spermien annähernd gleich.

Auch für NBD-PC (c, d; n=3) war die Fluoreszenzintensität des Markers in (PI++)-Zellen deutlich höher als in den (PI-). Im Gegensatz zu PS stieg in den toten Zellen die Intensität über die gesamte Messzeit weiter an. Die Integrität der Plasmamembran war offensichtlich so verändert, dass NBD-PC vermehrt aufgenommen wurde oder ins Zellinnere gelangen konnte und sich dort auch in andere Membranen einbaute. In lebenden Zellen erreichte die Einbaukurven nach ca. 30 min ein Plateau. Wurden die Eberspermien zunächst kapazitiert und anschließend markiert, konnte man vergleichbare Einbaukinetiken der NBD-PL (Abb. 11 (b) PS; (d) PC) beobachten.

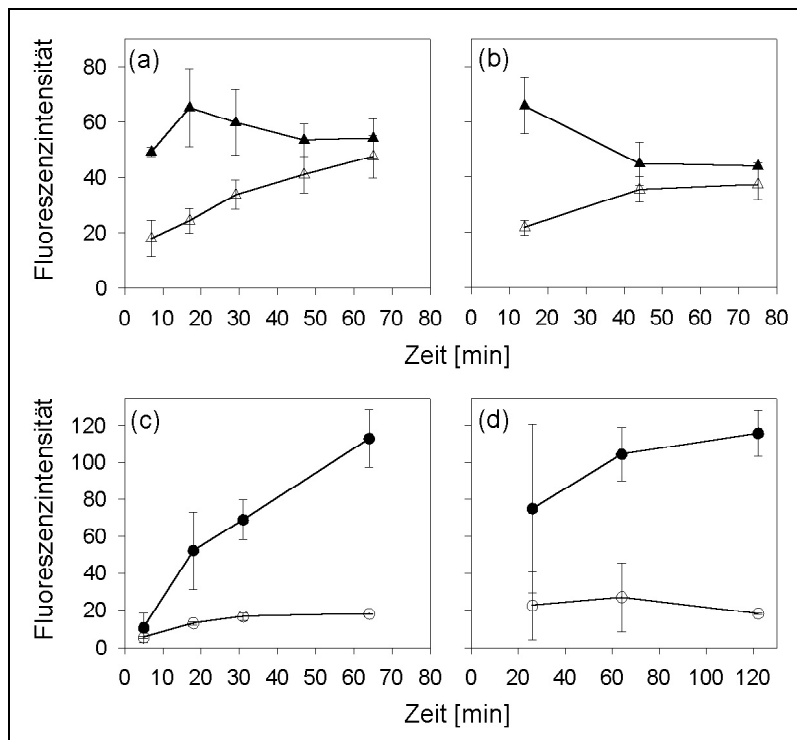


Abb. 11: Einbau NBD-markierter PL in die Membran von Eberspermien: In TALP gewaschene Spermien wurden vor (a, c) und nach (b, d) Kapazitation der Zellen mit NBD-PL markiert. Im Laufe der Markierung wurde je ein Aliquot der Spermiesuspension entnommen in der Messküvette für 2 min mit 2,5 µl PI gefärbt und am Durchflusszytometer gemessen. Gefüllte Symbole kennzeichnen (PI++)-Zellen, offene Symbole hingegen (PI--)-Zellen (▲△ NBD-PS, ●○ NBD-PC).

Für die Translokationsexperimente an Eberspermien war es erforderlich, zu jedem Untersuchungszeitpunkt einen Fluoreszenzwert vor und nach Dithionitzugabe zu ermitteln und zwischen lebenden und toten Zellen sauber zu unterscheiden.

3.1.3 Kombination verschiedener Fluoreszenzmarker

3.1.3.1 *Wechselwirkungen zwischen den Markern*

Um Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Markern bzw. Fluoreszenzgruppen auszuschließen, wurden zunächst alle Label in Einzel- und Doppelmarkierungen getestet. Bei allen Komarkierungen zeigte sich eine geringe Intensitätsverschiebung der Fluoreszenzpeaks. Solange die Peaks deutlich voneinander getrennt blieben, hatte dies keinen Einfluss auf die prozentuale Anzahl der Zellen, die rot (PI) oder grün (FITC-AnV, -PSA, -PNA, R123, NBD-PL) markiert erschienen. Allerdings mussten die Regionen der nicht (\emptyset), schwach (+) oder stark (++) gefärbten Spermien entsprechend angepasst werden.

Am Beispiel der FITC-AnV/PI Markierung von Eberspermien werden die beobachteten Wechselwirkungen genauer dargestellt. Für die Kombinationen von R123/PI sowie NBD-PL/PI wurden die gleichen Untersuchungen durchgeführt. Wechselwirkungen dieser Marker untereinander, die einen Einfluss auf die Auswertung der Messungen am Durchflusszytometer haben könnten, wurden ausgeschlossen.

Bei der Doppelmarkierung von Eberspermien mit FITC-AnV und PI kam es zu einer leichten Überschätzung des Anteils (PI++)-gefärbter Spermien und einer Unterbewertung des Anteils AnV-markierter Zellen durch die Intensitätsveränderungen der Fluoreszenzpeaks. Dies ließ zunächst einen Energietransfer vom FITC auf das PI vermuten.

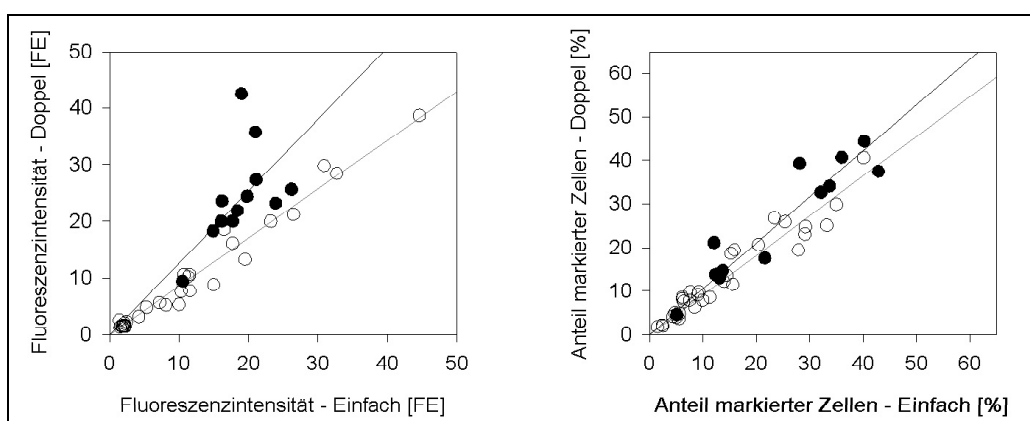


Abb. 12: Vergleich von Einzel- und Doppelmarkierung von Eberspermien mit FITC-AnV (\circ) und PI (\bullet).

Im linken Diagramm sind die arithmetischen Mittelwerte der Fluoreszenzpeaks (FITC bzw. PI) markierter Spermien aufgetragen, im rechten Diagramm dagegen der prozentuale Anteil der jeweils fluoreszenzmarkierten Zellen. Die Regressionsgeraden sollen die Tendenzen verdeutlichen. Für jeden Messpunkt wurde zunächst ein Aliquot der nur FITC-AnV markierten Spermien bzw. eines der nur PI-gefärbten Zellen vermessen. Im Anschluss wurde ein Aliquot der FITC-AnV markierten Spermien mit PI komarkiert und vermessen. Die PI-Färbung erfolgte für 5min in der Messküvette mit 2,5 μ l PI (1,88 μ M).

Abbildung 12 zeigt die Auswertungen von Einzel- und Doppelmarkierungen kapazitiver Eberspermien mit PI und/oder FITC-AnV nach Messung der Proben am Durchflusszytometer. Im linken Diagramm sind die arithmetischen Mittelwerte der Fluoreszenzpeaks markierter Spermien aufgetragen, im rechten dagegen der prozentuale Anteil der jeweils fluoreszenzmarkierten Zellen nach Anpassung der Regionen. Die Abbildung 12 macht deutlich, dass es durch die Anpassung der Auswertung (Verschiebung der Region markierter Zellen) trotz relativ großer Peakverschiebungen (relativ große Abweichung der Regressionsgeraden von der zu erwartenden Gerade $y=x$) möglich war, den Anteil stark markierter Spermien auch in den Doppelmarkierungen sicher zu bestimmen (relativ geringe Abweichung der Regressionsgeraden von der zu erwartenden Gerade $y=x$).

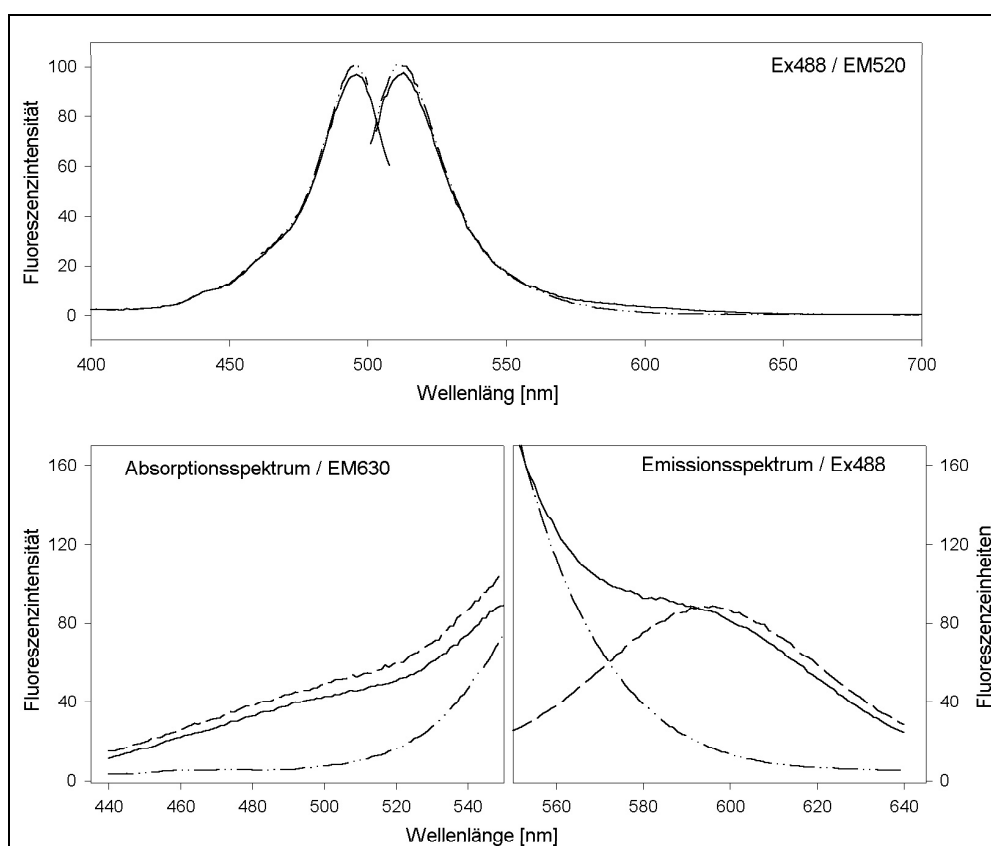


Abb. 13: Spektren von mit FITC-AnV und PI markierten Spermien: Die Zellen wurden wie in Material und Methoden beschrieben markiert und je 25 μ l der markierten Spermiesuspension in 2ml Puffer im Fluoreszenzspektrometer gemessen. Spaltbreite FITC-Fluoreszenz (oben): 5/10, PI-Fluoreszenz (unten): 10/20 PI (— —), FITC-AnV/PI (— — —), FITC-AnV (— · — · —).

Messungen am Fluoreszenzspektrometer (Abb.13) ergaben keinen Hinweis auf eine Energieübertragung von FITC-AnV auf PI. In diesem Fall hätte man einen Intensitätsanstieg

des Emissionsspektrums im Bereich roter Wellenlängen (600nm) bei doppelt markierten Spermien im Vergleich zu einfach markierten erwartet (unten rechts). Waren die Spermien nur mit einem der Label markiert, ergab sich hingegen eine geringfügig höhere Intensität im Absorptions- und Emissionsspektrum. Diese Tendenz wurde auch bei Komarkierung von R123 bzw. NBD-PL mit PI beobachtet. Abbildung 13 macht dies weiterhin deutlich, dass die Fluoreszenzspektren des FITC-AnV und des PI durch die optischen Filter des Durchflusszytometers (FL1: TK500, EM 515-560; FL3: TK610, RG630) sauber voneinander getrennt werden konnten. Die Fluoreszenzintensität des FITC war bei einer Anregung mit 488nm um Größenordnungen höher als die des PI.

Eine Wechselwirkung zwischen FITC-AnV und PI an Einzelzellen konnte mit den Messungen am Fluoreszenzspektrometer nicht bestätigt aber auch nicht ausgeschlossen werden. Die Untersuchungsbedingungen für markierten Zellen im Vergleich zu Messungen am Durchflusszytometer unterscheiden sich erheblich.

3.1.3.2 *Farbkompensierung am Durchflusszytometer*

Die im Bereich grüner Wellenlängen fluoreszierenden Label können mit dem 488nm-Argon-Laser wesentlich effektiver angeregt werden als die im roten Bereich emittierenden Label, deren Fluoreszenzanregung weit vor dem Extinktionsmaximum erfolgt. Um die roten Fluorophore überhaupt anregen zu können, ist eine relativ hohe Laserleistung nötig. Dies hat ein gewisses Überstrahlen der Grünfluoreszenz in den Rotkanal zur Folge, da mit zunehmender Fluoreszenzintensität auch die Breite des Emissionspeaks zunimmt. Zu Beginn eines jeden Versuchstages wurde deshalb eine mit einem grünen Fluoreszenzlabel (z.B. FITC-AnV) markierte Spermienprobe am Durchflusszytometer gemessen und die entsprechende Kompensierung festgelegt. Zahlreiche Kontrollen haben gezeigt, dass bei gleichbleibendem Markierungsprotokoll diese Kompensierung für alle folgenden Doppelmarkierungen übernommen werden kann.

3.2 Die transversale Lokalisation der Phospholipide in der Plasmamembran von Eberspermien während der Genese - Durchflusszytometrische Analysen

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Durchflusszytometrie von unterschiedlich markierten Eberspermien während der Kapazitation und Akrosomreaktion zusammenhängend dargestellt. Zahlreiche Untersuchungen der markierten Eberspermien erfolgten zudem mikroskopisch. Die Ergebnisse dieser Versuche werden im Kapitel 3.3 zusammengefasst.

3.2.1 Transversale Organisation fluoreszenzmarkierter Phospholipidanaloga

3.2.1.1 *Einwärtstranslokation der NBD-Phospholipide*

Für alle Translokationsexperimente erfolgte der Einbau der NBD-PL in die Plasmamembran der Eberspermien für NBD-PS 2-10 min und für NBD-PC 20-30 min (wenn nicht anders angegeben).

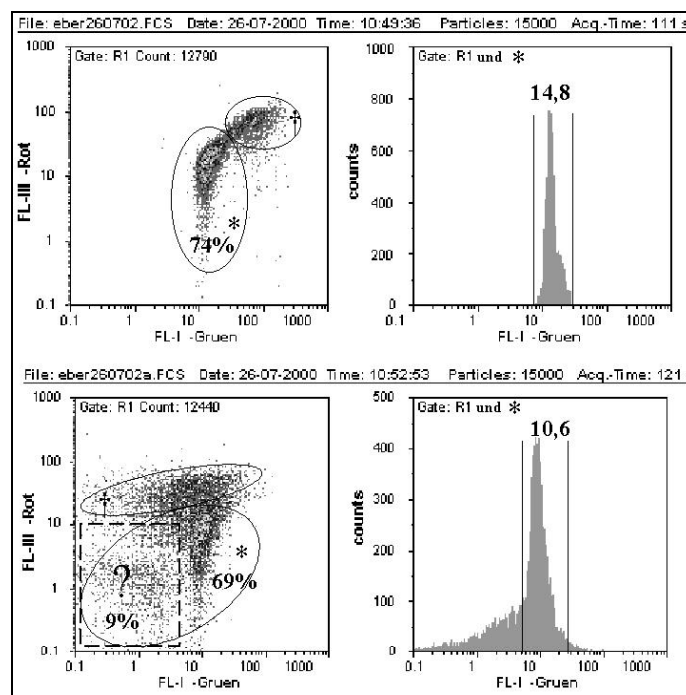


Abb. 14: Auswertung durchflusszytometrischer Messungen zur Translokation von NBD-PL: In TALP gewaschene Eberspermien wurden für 5 min mit NBD-PS und PI (1,8 μ M) markiert und ein Aliquot in 2 ml TALP am Durchflusszytometer analysiert (obere Abb.). Direkt in die Messküvette wurde im Anschluss an die erste Messung 10 mM Dithionit gegeben und die Probe nach 1 min noch einmal gemessen (untere Abb.). Im 2-Parameter-Plot der Fluoreszenzen wurden die Populationen lebender (*) und toter (†) Zellen festgelegt. Im Histogramm der NBD-Fluoreszenz wird die Verschiebung des Intensitätspeaks (angegeben ist der arithmetische Mittelwert) intakter Spermien deutlich sichtbar. Die Markierung und Messung erfolgte bei Raumtemperatur.

Die PI-Färbung erfolgte unmittelbar vor der jeweiligen Messung (1,88 μ M) für 5 min in der Messküvette. Je ein Aliquot der markierten Spermienprobe wurde zunächst ohne und 3 min später mit Dithionit (10 mM, 1 min) am Durchflusszytometer gemessen.

Anhand der Abbildung 14 soll die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen der mit NBD-PL markierten Spermien erläutert werden. Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzintensität lebender und toter Spermien war eine Auswertung in Quadranten (unmarkiert / nur grün / nur rot / rot und grün) nicht möglich. Deshalb wurden im 2-Parameter-Plot der Fluoreszenzen die Populationen lebender (*) und toter (†) Zellen durch Festlegung von Regionen eingeteilt. Die Fluoreszenzintensitäten und die Anzahl der in diesen Regionen registrierten Zellen konnten somit separat ausgewertet werden.

Der Anteil PI-unmarkierter Partikel, deren NBD-Fluoreszenz des PS-Labels zu einem großen Teil oder komplett gelöscht werden konnte (siehe Abb.14, unteres Bild, ?, gestrichelter Kasten, 9%) betrug bei gewaschenen $12\pm 7\%$ (n=14), bei kapazitierten $24\pm 6\%$ (n=15) und bei akrosomreagierten Eberspermien $35\pm 9\%$ (n=3). Für die weitere Auswertung der Translokationsexperimente wurden bei den Versuchen mit NBD-PS-Markierung nur die lebenden Zellen betrachtet, deren Fluoreszenz im Bereich des schmalen Peaks, wie im Histogramm (Abb. 14) eingezeichnet, lag. Bei den Versuchen mit NBD-PC-Markierung war eine derartige Ausgrenzung nicht möglich.

Der Labelanteil, der sich zum Zeitpunkt der Messung auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran befand, wurde wie folgt berechnet:

$$L_{innen} = \frac{\text{FluoreszenzIntensität(nachDithionit)} - \text{Eigenfluoreszenz}}{\text{FluoreszenzIntensität(vorDithionit)} - \text{Eigenfluoreszenz}} \times 100\%$$

Um den Anfangsbereich der Kinetik der PS-Translokation messen zu können, wurde eine minimale Markierungszeit von 2 min für den Einbau des NBD-PS und 3 min für die PI-Färbung (1,88 μ M) nach Überführen des Aliquots in die Messküvette gewählt. Zum Zeitpunkt der ersten Messung am Durchflusszytometer befanden sich bei membranintakten Zellen bereits 64% des NBD-PS auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran, während nach 10 min nur 8,5% des NBD-PC für die Reduktion durch Dithionit unzugänglich waren. NBD-PS wurde bei frischen Eberspermien zu $93\pm 7\%$ (n=5, 80 min) auf der zytoplasmatischen Seite angereichert. Die Translokation von NBD-PC erfolgte hingegen sehr langsam. Nach 95 min befanden sich bei lebenden Zellen $36\pm 2\%$ (n=3) auf der zytoplasmatischen Seite.

Abbildung 15 zeigt die Auswertung der Translokationsexperimente an frisch gewaschenen sowie an kapazitierten Eberspermien. Für NBD-PC wurde in den drei gepaarten Versuchen keine Änderung der Geschwindigkeit oder des Ausmaßes der Einwärtsbewegung des Analogons gefunden. Die Translokation des NBD-PS zur zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran war hingegen bei den kapazitierten Eberspermien immer verlangsamt.

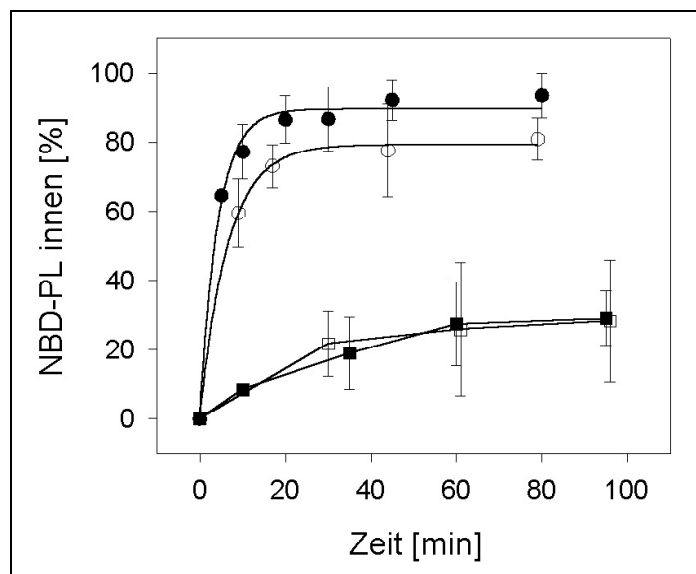


Abb. 15: Kinetik der Translokation NBD-markierter PL in der Zellmembran von Eberspermien. Dargestellt sind Mittelwerte (NBD-PS: $n=5$, \bullet ; NBD-PC: $n=3$, \blacksquare) und Standardabweichung. Die Translokationsdaten für NBD-PS wurden an eine monoexponentielle Funktion angepasst. Geschlossene Symbole kennzeichnen die Werte für frisch gewaschene Spermien, offene Symbole hingegen Werte für kapazitierte Zellen.

Die monoexponentiellen Anpassungen an die gemittelten Translokationsdaten von NBD-PS ergaben für frische Spermien: $L_{\text{innen}} = 89,5 \pm 1,7\%$, $k_i = 0,236 \pm 0,024 \text{ min}^{-1}$ und für kapazitierte Eberspermien: $L_{\text{innen}} = 79,2 \pm 0,9\%$, $k_i = 0,153 \pm 0,008 \text{ min}^{-1}$. Ein statistischer Vergleich der Einzelwerte mittels t-Test weist eine signifikante Verringerung des zytoplasmatisch akkumulierten Labelanteils in kapazitierten Spermien nach 10 min sowie nach 80 min, nicht aber zwischen den Werten bei 45min auf.

In die Auswertung der Translokationskinetiken wurden nur die Versuche mit einbezogen, bei denen mindestens 60% der Spermien nach der entsprechenden Inkubation vital waren. Proben, in denen die Lebensfähigkeit der Spermien zu schlecht war, zeigten auch bei den PI-ungefärbten Zellen eine deutlich verlangsamte Translokation des NBD-PS – unabhängig von der Vorbehandlung der Zellen. Die Abbildung 16 soll diesen Zusammenhang deutlich

machen. Von 10 Einzelversuchen wurde der Anteil lebender (PI-negativer) Zellen im Verhältnis zum Anteil des zytoplasmatisch angereicherten NBD-PS in den lebenden Spermien dargestellt. Vergleichende Versuche an Spermienproben verschiedener Eber zeigten des weiteren eine schnellere Translokation von NBD-PS in den Proben, deren Morphologie, Stabilität im Thermoresistenztest und Akrosomreaktionsvermögen am besten war (Daten nicht gezeigt).

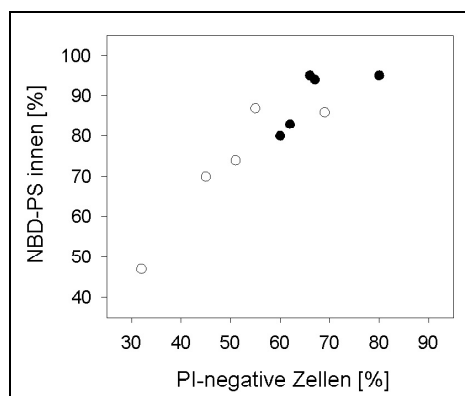


Abb. 16: Zusammenhang zwischen der Gleichgewichtsverteilung des NBD-PS in der PM und dem Anteil lebender Zellen in den untersuchten Spermienproben: Dargestellt sind die Ergebnisse von 10 unabhängigen Einzelversuchen (● frische, ○ kapazitierte Eberspermien). In Proben, in denen viele tote (PI++) Zellen enthalten sind, wird auch in den lebenden (PI-) Spermien NBD-PS in geringerem Ausmaß auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran akkumuliert.

3.2.1.2 Auswärtstranslokation der NBD-Phospholipide

Ziel dieser Versuche war es, unterscheiden zu können, ob die Verlangsamung der Translokation durch eine schnellere Auswärtsbewegung der Phospholipide in der Plasmamembran oder durch einen tatsächlich verlangsamten Einwärtstransport erklärt werden kann. Dazu wurden die zuvor inkubierten Eberspermien (frisch gewaschen bzw. kapazitiert) mit NBD-markierten Phospholipiden gelabelt und schließlich aller zugänglicher Label reduziert bzw. mit BSA entzogen. Die nun nur auf der zytoplasmatischen Seite markierten Eberspermien wurden weiter im BSA-haltigen TALP inkubiert (bei RT bzw. 38,5°C). Ein Aliquot wurde in Abständen am Durchflusszytometer vermessen. Abbildung 17 zeigt die Auswertung von je zwei unabhängigen Versuchen. Die Auswärtstranslokation des NBD-PC zur exoplasmatischen Seite erfolgte in allen Versuchen schneller als die des NBD-PS. Lediglich 8-15% der NBD-PS-Analoga erschienen innerhalb der 2ständigen Messdauer auf dem äußeren Monolayer der Plasmamembran.

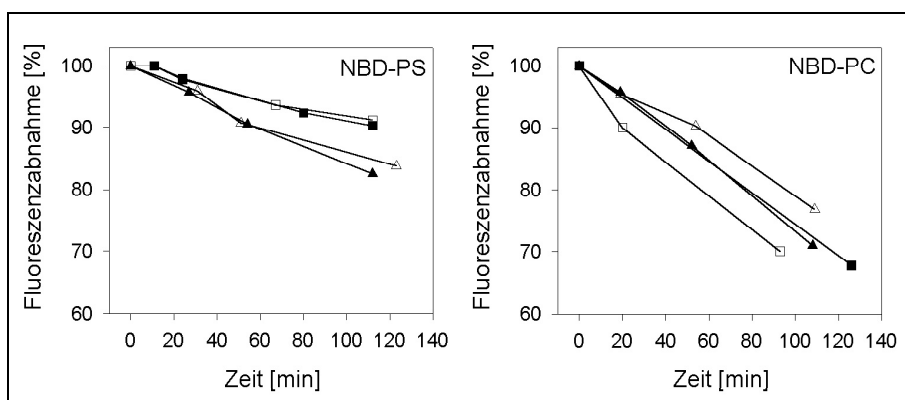


Abb. 17: Auswärtsbewegung NBD-markierter PL in der Zellmembran von Eberspermien. Dargestellt sind je 2 unabhängige Versuche. Geschlossene Symbole kennzeichnen die Werte für frisch gewaschene, bei RT inkubierte Spermien, offene Symbole hingegen Werte für kapazitierte Spermien.

In lebenden Spermienzellen konnte keine Änderung der Auswärtsbewegung der Phospholipide nach Kapazitation nachgewiesen werden.

3.2.2 Exposition von endogenem PS: FITC-AnV/PI-Markierung von Eberspermien

3.2.2.1 *Veränderung der FITC-AnV/PI-Markierung im Verlauf der Inkubation*

Die kalziumvermittelte Bindung von FITC-AnV an endogenes PS wurde in Kombination mit dem Lebend-Tot-Farbstoff PI als Marker der transversalen Asymmetrie der Phospholipide in der Zellmembran der Eberspermien genutzt. Die Stabilität der Phospholipidasymmetrie wurde während der In-vitro-Kapazitation und Akrosomreaktion untersucht.

Zur Kontrolle der Inkubationsbedingungen wurde mittels PSA-Markierung der Anteil akrosomreagerter Spermien verfolgt. In allen untersuchten Proben konnte die Akrosomenreaktion in kapazitierten Eberspermien durch die Zugabe des Kalziumionophors ausgelöst werden. Aus der Differenz PI-gefärbter und PSA-markierter Zellen ergibt sich jeweils der Anteil lebender akrosomreagerter Spermien (*), der für die Routineuntersuchung von Eberspermien bewertet wird. Im rechten Diagramm der Abbildung 18 wird dies am Beispiel einer Spermienprobe mit sehr stabiler Lebensfähigkeit verdeutlicht. Der Anteil AnV-bindender Zellen war in dieser Probe über den gesamten Inkubationszeitraum sehr niedrig.

Generell bindet die Mehrzahl ($87 \pm 6\%$) der frischen, in TALP gewaschen Eberspermien FITC-AnV nicht. Lediglich $6 \pm 3\%$ der Zellen erscheinen mit FITC-AnV markiert. Eine 10 minütige Inkubation der Spermien bei $38,5^\circ\text{C}$ in TALP ohne Heparin führte zu einer Zunahme der

FITC-AnV-Bindung an die Zellen. Gleichzeitig stieg aber auch die Anzahl der PI-gefärbten Zellen. Nach Kapazitation der Eberspermien kam es zu einer signifikanten Zunahme der FITC-AnV-bindenden und der PI-gefärbten Spermien. Abbildung 18 und Tabelle 6 zeigen die Ergebnisse von 12 Versuchen, bei denen im Zeitverlauf der Spermieninkubation mehrmals eine Markierung und durchflusszytometrische Analyse eines Aliquots der Proben erfolgte.

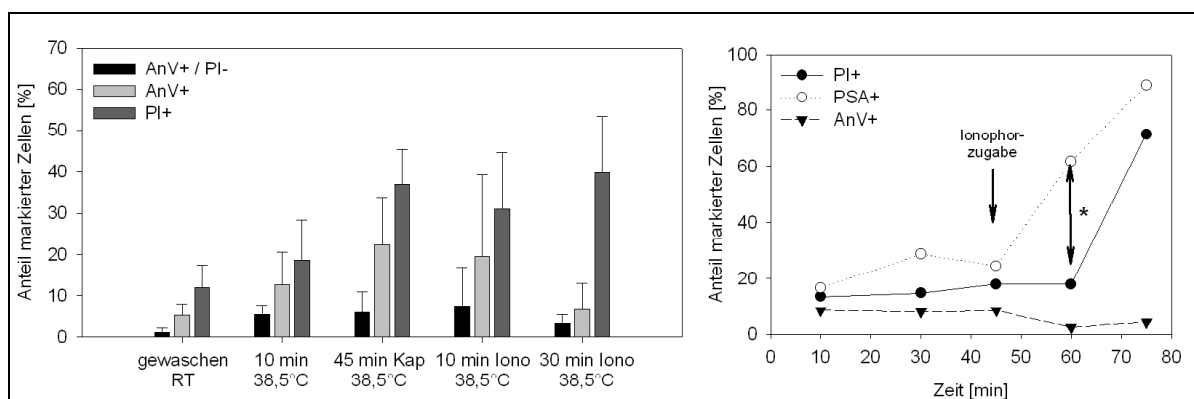


Abb. 18: Markierung von Eberspermien im Verlauf der In-vitro-Inkubation der Zellen: Dargestellt sind das veränderte AnV-Bindungsverhalten, die zunehmende Destabilität der Plasmamembran (PI-Färbung) sowie die Akrosomreaktion – gekennzeichnet durch eine PSA-Bindung an Komponenten des akrosomalen Inhalts. Die Eberspermien wurden entsprechend des Protokolls „Kapazitation IFN“ 45 min kapazitiert. Anschließend wurde die Akrosomreaktion durch Zugabe eines Kalziumionophors ausgelöst. Die Markierung erfolgte entsprechend der Angaben im Methodikteil. Im linken Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Anteile markierter Zellen von 12 unabhängigen Versuchen dargestellt. Das rechte Diagramm verdeutlicht hingegen am Beispiel einer Spermienprobe mit sehr stabiler Lebensfähigkeit die Auslösbarkeit der Akrosomreaktion in lebenden, kapazitierten (*) Spermien durch Ionophorzugabe. Der Anteil AnV-bindender Zellen war in dieser Probe über den gesamten Inkubationszeitraum sehr niedrig.

Nach 30minütiger Inkubation der kapazitierten Eberspermien mit dem Ionophor nahm die Anzahl lebender Zellen signifikant ab. Die Intensität der FITC-AnV-Bindung und der Anteil FITC-AnV-markierter Zellen sank hingegen nach Ionophorzugabe ab. Bei den meisten Spermienproben war nach 30 min durchflusszytometrisch keine intensive FITC-AnV-Markierung der Zellen detektierbar. Ein Quenching der FITC-Fluoreszenz durch das Ionophor konnte entsprechend der mikroskopischen Untersuchungen (siehe 3.3.2, S.76ff) ausgeschlossen werden.

Tab. 6: Entwicklung der AnV/PI-Markierung von Eberspermien im Zeitverlauf der In-vitro-Kapazitation und Akrosomreaktion: Ausgewertet wurden 12 unabhängige Einzelversuche, deren durchflusszytometrische Ergebnisse als Mittelwert und Standardabweichung der prozentualen Anteile der jeweiligen Zellenkategorie angegeben sind. Der gepaarte t-Test der Ausgangsdaten ergab zwischen den gekennzeichneten Gruppen signifikante Unterschiede ($P_{a/b} < 0,0005$; $P_{c/d} < 0,005$; $P_{e/f} < 0,05$).

	AnV-/PI- [%]	Σ AnV+ [%]	AnV+/PI- [%]	AnV+/PI+ [%]	Σ PI+ [%]
gewaschen in TALP	87 ± 6^a	5 ± 3^c	1 ± 1	4 ± 2^c	$12 \pm 5^{a,c}$
10 min bei 38,5°C	76 ± 12	13 ± 8	5 ± 2	7 ± 6	19 ± 10^e
Kapazitation für 45 min	57 ± 11^b	22 ± 11^d	6 ± 5	17 ± 8^d	$37 \pm 8^{d,f}$
10 min Kalziumionophor	62 ± 23	20 ± 22	8 ± 9	12 ± 13	31 ± 14^f
30 min Kalziumionophor	57 ± 14^b	7 ± 6^c	3 ± 2	3 ± 4^c	$42 \pm 16^{b,f}$

3.2.2.2 Variabilität der FITC-AnV/PI-Markierung kapazitierter Eberspermien

Im Laufe der Untersuchungen zu dieser Arbeit wurden viele verschiedene Spermienproben hinsichtlich ihrer FITC-AnV-Bindung nach Kapazitation analysiert. Dabei unterschieden sich nicht nur die Prozentsätze der jeweils markierten Spermien erheblich, sondern auch die Intensität der AnV-Markierung.

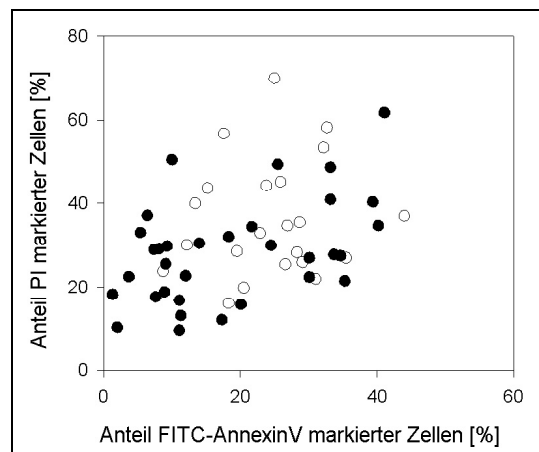


Abb. 19: AnV-Markierung und PI-Färbung kapazitierter Eberspermien: Die Inkubation der Spermien erfolgte entweder für 45 min bei 38,5°C im Wärmeblock (●) oder für 2 h im Zellkulturschrank bei 38,5°C (○), die nachfolgende Markierung für 5 min bei 38,5°C im Dunkeln (1 µg/ml FITC-AnV, 1,9-6 µM PI).

In Abbildung 19 sind die prozentualen Anteile FITC-AnV-markierter und PI-gefärbter Spermien der einzelnen Versuche gegeneinander aufgetragen. Abbildung 20 zeigt charakteristische Bilder der 2-Parameter-Darstellung kapazitierter, FITC-AnV- und PI-markierter Spermien am Durchflusszytometer. Die Inkubation der Eberspermien erfolgte bei

den in Abbildung 20 dargestellten Beispielen jeweils entsprechend des Protokolls „Kapazitation IFN“ für 45 min bei 38,5°C in TALP (+BSA, +CaCl₂, +Heparin).

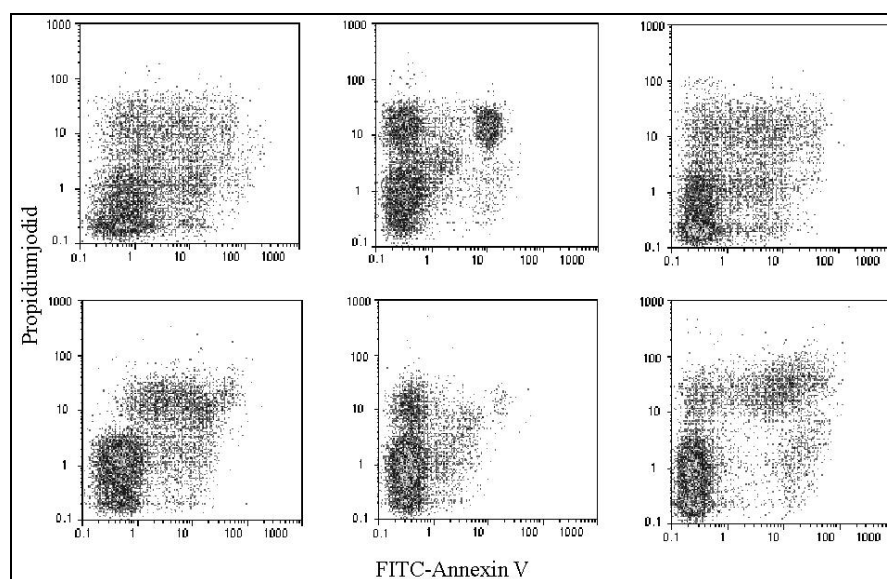


Abb. 20: Variabilität der AnV / PI – Markierung verschiedener Spermienproben nach Kapazitation: Dargestellt sind die 2-Parameter-Diagramme der FITC und der PI Fluoreszenz durchflusszytometrisch untersuchter Eberspermien. Die Inkubation der Zellen erfolgte nach dem Protokoll „Kapazitation IFN“, die nachfolgende Markierung für 5min bei 38,5°C im Dunkeln (1µg/ml FITC-AnV, 3µM PI).

3.2.2.3 Einflussfaktoren auf die FITC-AnV/PI-Markierung kapazitierter Eberspermien

Hinsichtlich der Aufarbeitung und Inkubation der Eberspermien wurden entsprechend den Erläuterungen im Methodikteil folgende Faktoren variiert: (i) zweimaliges Waschen in TALP oder Aufreinigung über Percollgradienten, (ii) eine Inkubation in An- bzw. Abwesenheit von Kanamycin, BSA, CO₂, Heparin und (iii) eine Verlängerung der Kapazitationsdauer von 45 min auf bis zu 4 h.

Percoll

(i) Im Vergleich zum zweimaligen Waschen in TALP wurden die flüssigkonservierten Spermien über einen Percollgradienten aufgereinigt, um aufgelagerte Seminalplasma-Proteine, die eventuell eine AnV-Bindung blockieren könnten, effektiver zu entfernen. In einem gepaarten Versuch zeigte sich bei den über Percoll aufgereinigten Spermien ein geringerer Anteil markierter Spermien im Vergleich zu den in TALP gewaschenen Zellen (Σ AnV+ 2%/4%, PI+ 5%/13% und AnV+/PI- 0,3%/2%). Offensichtlich wurden durch die Percollzentrifugation intakte Spermien selektiv angereichert und Verunreinigungen effektiv

abgetrennt. Auch im Streulicht, dass eine eng abgegrenzte Spermienpopulation zeigte, wurde die bessere Trennung der Spermien von anderen Partikeln deutlich.

Tab. 7: Einfluss einer Percollaufbereitung der Spermien auf den Anteil AnV- und PI-markierter Zellen nach Kapazitation: Die Inkubation der Spermien erfolgte für 45 min im WB. Angegeben sind die prozentualen Anteile markierter Zellen nach Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen zweier gepaarter Versuche.

	AnV+/PI-		AnV +		PI +	
in TALP gewaschen	6,2%	15,1%	14,9%	29,1%	42,2%	25,9%
über Percoll aufgereinigt	0,9%	6,0%	8,6%	26,6%	45,7%	25,4%

Nach Kapazitation unterschied sich der prozentuale Anteil PI-gefärbter Zellen zwischen den beiden Varianten nicht mehr, während der Anteil AnV-bindender Spermien in den Varianten nach Percollaufbereitung etwas niedriger war. Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse von zwei gepaarten Versuchen. Ein Teil der durchflusszytometrisch erfassten (AnV+/PI-)-Partikel in den einfach gewaschenen Proben könnte somit von zusammengelagerten Plasmatrophen, abgelösten Kopfkappen oder anderen “Nicht-Spermien-Ereignissen” herrühren.

(ii) Bei der Flüssigkonservierung und der In-vitro-Inkubation von Spermienzellen werden häufig Antibiotika zur Unterdrückung des Keimgehaltes eingesetzt. Es sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit von Kanamycin während der Kapazitation der Eberspermien einen Einfluss auf deren Lebensfähigkeit oder die transversale Phospholipidasymmetrie hat.

Kanamycin

In einem gepaarten Versuch führte die Anwesenheit von Kanamycin im HBT-Kapazitationsmedium zu einer stärkeren Destabilisierung der Plasmamembran im Vergleich zur Kapazitation in HBT ohne Kanamycin. Der Anteil PI-gefärbter Zellen war erhöht (19,8 %/13,9 %), ebenso der Anteil AnV-bindender Zellen (gesamt: 41,7 %/27,9 % bzw. AnV+/PI-: 27,3 %/21,4 %). In diesem Versuch wurde scheinbar ein Scrambling der Phospholipide durch Kanamycin gefördert, allerdings war der Anteil AnV-bindender bzw. PI-gefärbter Zellen in der Variante ohne Antibiotikum auch sehr hoch. Weitere Versuche zur Kapazitation von Eberspermien in HBT (+Kanamycin) für zwei Stunden ergaben im Mittel keine Erhöhung des Anteils AnV-bindender Spermien (AnV+/PI- $3 \pm 2\%$, AnV+ $8 \pm 4\%$, PI+ $29 \pm 5\%$, $n=5$) verglichen mit mittleren Werten nach zweistündiger Kapazitation (siehe Tabelle 10). Diese Spermienproben zeigten jedoch alle eine sehr stabile Lebensfähigkeit, ein direkter Vergleich ohne Kanamycin erfolgte bei diesen Versuchen nicht.

Kapazitationsfaktoren

Als wichtige Kapazitationsfaktoren gelten unter anderem BSA, HCO_3^- und Heparin (siehe Einleitung). Ziel der folgenden Versuche war es, einen eventuellen Effekt einer der Substanzen auf die Membranintegrität während der Kapazitation von Eberspermien zu untersuchen. Die Gegenwart von BSA im Kapazitationsmedium führte zu einem starken Anstieg des Anteils PI-gefärbter Zellen im Vergleich zu dem Aliquot, das ohne BSA inkubiert wurde. Der Anteil AnV-bindender Spermien war in den Proben vergleichbar. Die gleiche Tendenz zeigte sich beim Vergleich der Inkubation im Wärmeblock bzw. im Zellkulturschrank (5% CO_2). Im Zellkulturschrank starben die Spermien in den unten dargestellten Versuchen massiv ab. Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse der gepaarten Versuche mit und ohne BSA und CO_2 im Überblick.

Tab. 8: Einfluss von BSA und CO_2 auf die FITC-AnV/PI Markierung kapazitierter Spermien: Angegeben sind die prozentualen Anteile markierter Zellen nach Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen bzw. die Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 gepaarten Versuchen.

Einzelmarkierung	AnV +		PI +	
ohne BSA	40,1%		15,5%	
mit BSA	35,0%		41,4%	

Doppelmarkierung	AnV+ / PI-		AnV +		PI +	
ohne CO_2	7,5%	15,3%	21,1%	20,1%	39,2%	37,4%
mit CO_2	7,9%	7,1%	32,1%	20,0%	56,7%	67,0%

ohne BSA / mit CO_2	$7,4 \pm 5,4 \%$	$15,0 \pm 8,4 \%$	$27,2 \pm 3,6 \%$
mit BSA / ohne CO_2	$7,3 \pm 3,7 \%$	$17,0 \pm 6,3 \%$	$34,8 \pm 5,6 \%$

In den Versuchen, die eine Inkubation mit und ohne BSA kombiniert mit der Ab- bzw. Anwesenheit von CO_2 untersuchten, war kein Unterschied hinsichtlich der Membranintegrität zu erkennen. Sie dienten vor allem zur Kontrolle der Inkubationsbedingungen beim Einbau von NBD-PL in die Zellmembran der Eberspermien. Für die Ergebnisse dieser 4 gepaarten Versuche sind in der Tabelle 8 die Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Anteile markierter Spermien angegeben. Sowohl die AnV-Markierung als auch die PI-Färbung waren in diesen Versuchen unabhängig von der Anwesenheit von BSA und CO_2 während der Inkubation der Spermien.

Tab. 9: Einfluss von Heparin auf die FITC-AnV/PI-Markierung kapazitierter Spermien: Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Anteile markierter Zellen nach Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen von 6 gepaarten Versuchen. Der gepaarte t-Test ergab bezüglich des Anteils PI-gefärbter Zellen einen signifikanten Unterschied ($P_{a/b}=0,02$) zwischen den beiden Versuchsvarianten.

	AnV+ / PI-	AnV +	PI +
ohne Heparin	12,4 ± 4,8 %	22,9 ± 8,3 %	24,0 ± 12,6 % ^a
mit Heparin	14,2 ± 6,1 %	24,7 ± 13,0 %	29,2 ± 13,2 % ^b

Erfolgte die Kapazitation der Eberspermien mit Heparin im Kapazitationsmedium, war der Anteil PI-gefärbter Zellen im Vergleich zu den Proben, die ohne Heparin inkubiert wurden, signifikant erhöht ($P=0,02$). Hinsichtlich der AnV-Bindung ergaben die Versuche, deren Ergebnisse in Tabelle 9 dargestellt sind, keinen signifikanten Unterschied.

Unter den getesteten Versuchsbedingungen konnte keiner der untersuchten Kapazitationsfaktoren (BSA, CO₂, Heparin) ein massives Scrambling der Phospholipide in der Plasmamembran lebender Spermien induzieren, obwohl sich die Membranstabilität gegenüber dem PI durch ihre Anwesenheit während der Kapazitation deutlich verringerte.

Kapazitationsdauer

(iii) Eberspermien wurden vergleichsweise für 45 min im Wärmeblock oder für bis zu 4 h im Zellkulturschrank jeweils bei 38,5°C inkubiert. Eine 2-4stündige Kapazitation führte zu einem Abfall des Anteils intakter Spermien. Sowohl der Anteil AnV-bindender als auch der Anteil PI-gefärbter Zellen nahm zu. Tabelle 10 zeigt zusammenfassend die Mittelwerte und Standardabweichungen der bereits in Abbildung 19 dargestellten Versuche. Eine statistische Auswertung der Ausgangsdaten mittels t-Test ergab einen signifikanten Anstieg des Anteils PI-gefärbter Spermien ($P=0,03$) nach 2stündiger Inkubation im CO₂-Schrank.

Tab. 10: Einfluss der Inkubationszeit auf den Anteil AnV- und PI-markierter Spermien nach Kapazitation: Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Anteile markierter Zellen nach Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen. Der t-Test ergab bezüglich der AnV-Markierung signifikante Unterschiede ($P_{a/b}=0,06$; $P_{c/d}=0,03$) zwischen den beiden Versuchsvarianten.

	AnV+/PI-	AnV+	PI+
1 h; 38,5°C (n=33)	7,8 ± 5,3 %	18,7 ± 12,5 % ^a	28,5 ± 12,3 % ^c
2 h; CO ₂ ; 38,5°C (n=22)	9,3 ± 6,0 %	24,5 ± 8,4 % ^b	36,3 ± 13,9 % ^d

Der Anteil AnV-markierter, lebender Spermien erhöhte sich auch nach einer Inkubation im Zellkulturschrank für 2 h nicht.

3.3 Die transversale und laterale Lokalisation von PS in Eberspermien – mikroskopische Untersuchungen zur Zell- und Membranmorphologie

Um weitere Erkenntnisse über den morphologischen Zustand AnV-positiver Spermien zu erhalten und somit genauere Aussagen zur Lokalisation des PS zu erhalten, wurden mikroskopische Untersuchungen angeschlossen. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Mikroskopie markierter Eberspermien dargestellt.

3.3.1 Transversale Organisation von NBD-PS in kapazitierten Eberspermien

In TALP (ohne BSA) gewaschene Eberspermien wurden für 10 min mit NBD-PS markiert. Nicht eingebaute bzw. nicht zur zytoplasmatischen Seite transportierte Label wurde durch Waschen in BSA-haltigem TALP (6 mg/ml) entfernt. Die Spermien blieben morphologisch intakt und motil. Die Mehrzahl der Spermien erschien über ihre gesamte Oberfläche gleichförmig intensiv grün markiert. Schwach grün fluoreszierende Zellen nahmen den Lebend-Tot-Farbstoff PI auf.

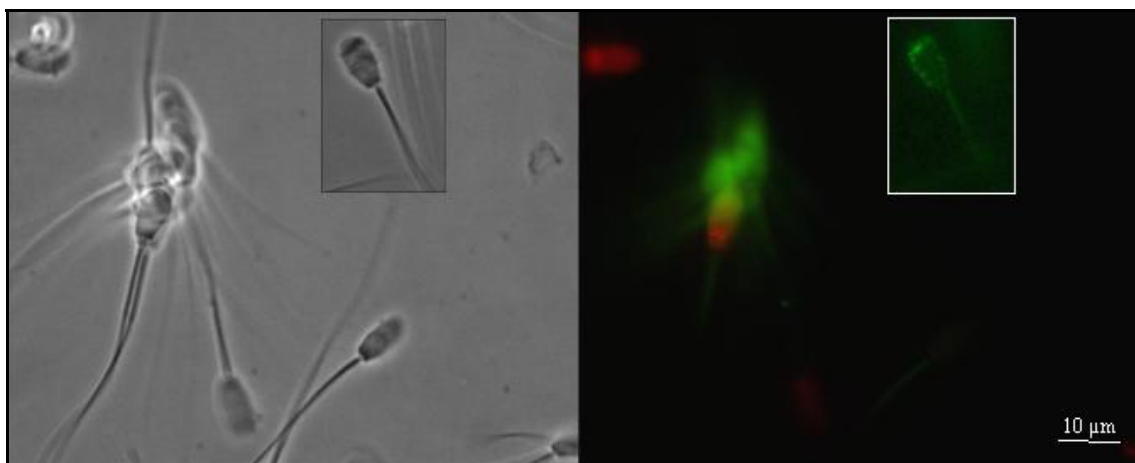


Abb. 21: Mit NBD-PS markierte Eberspermien nach kapazitiver Inkubation: Die Zellen wurden mit NBD-PS markiert (siehe Material und Methoden) und für 45 min bei 38,5°C in BSA-haltigem TALP kapazitiert. Unmittelbar vor Entnahme der Probe zur Mikroskopie wurde die NBD-Fluoreszenz zugänglicher Label mit Dithionit gelöscht. Die linke Bildhälfte zeigt jeweils das Phaseninterferenzbild zur morphologischen Differenzierung der Zellen, die rechte hingegen das NBD-Fluoreszenzbild der untersuchten Spermien.

Nach einer 45 minütigen Kapazitation der Eberspermien blieb der Großteil der Zellen gleichförmig markiert. In PI-gefärbten Spermien führte die Zugabe von Dithionit zum vollständigen Löschen der NBD-Fluoreszenz. PI-negative Zellen sowie ein Teil der

markierten Vesikel zeigten hingegen weiterhin eine intensive NBD-Fluoreszenz. Abbildung 21 zeigt beispielhaft NBD-PS/PI markierte Eberspermien nach Kapazitation. In den Proben NBD-PS/PI markierter Eberspermien wurde nie ein motiles oder PI-negatives Spermium beobachtet, dessen NBD-Fluoreszenz gelöscht werden konnte. Einige geschlossene Vesikel mit einer Lokalisation von NBD-PS im inneren Monolayer entstanden scheinbar durch vorzeitig ablaufende Akrosomreaktionen in den Proben kapazitierter Eberspermien. Eine genauere Auswertung dieser Versuche (Fluoreszenzintensitäten von Einzelzellen oder Vesikeln vor und nach Dithionitzugabe, prozentualer Anteil der Zellen einer Subpopulation) wurde aus folgenden Gründen nicht durchgeführt:

- (i) Die Beobachtung eines Spermiums vor und nach Dithionitzugabe bei motilen, frei schwimmenden Zellen ist nicht möglich.
- (ii) Um die Kapazitation der Spermien nicht zu blockieren, wurde der Stoffwechsel und damit verbunden auch der Abbau von NBD-PS nicht inhibiert. Ein Teil der NBD-Label war nach der Inkubation der Zellen sicher nicht mehr an den eigentlichen Marker (PS) gebunden.

Für alle weiteren Untersuchungen wurde deshalb die Bindung von FITC-AnV an endogenes PS genutzt.

3.3.2 Lokalisation von endogenem PS in lebenden Eberspermien

An frisch gewaschenen Eberspermien wurde keine AnV-Bindung beobachtet, während zahlreiche abgelöste Zytoplasmatropfen intensiv mit FITC-AnV markiert waren (Bilder nicht gezeigt).

Nach Kapazitation der Eberspermien erschien die Mehrzahl der Zellen hyperaktiviert, agglutiniert und unmarkiert. Eine FITC-AnV-Markierung wurde vor allem an nicht agglutinierten, PI-gefärbten Spermien beobachtet. Abbildung 22 zeigt charakteristische Bilder kapazitierter, FITC-AnV/PI-markierter Eberspermien. Sowohl an morphologisch intakten als auch an vorzeitig akrosomreagierten Eberspermien, deren Kopfkappen sich oftmals als kompakte Strukturen abheben, bindet FITC-AnV im Bereich des Akrosoms. Relativ selten beobachtet man vorzeitig akrosomreagierte Zellen, bei denen sich kleine Membranvesikel, die teilweise FITC-AnV binden, vom apikalen Kopfbereich ablösen. Spermien, deren Akrosom komplett abgelöst war, zeigten am vorderen Kopfbereich hingegen keine FITC-AnV-Bindung, waren aber immer mit PI-gefärbt. Ein ebenfalls charakteristisches wenn auch relativ seltenes Bindungsmuster von FITC-AnV an kapazitierte, jedoch morphologisch defekte Spermien, scheint die Markierung der Becherhülse zu sein. Im Schwanzbereich der

Eberspermien assoziierte Zytoplasmatropfen zeigten nur dann eine FITC-AnV-Bindung, wenn die Zelle PI gefärbt war.

Nach Auslösen der Akrosomreaktion durch Zugabe eines Kalziumionophor zu kapazitierten Eberspermien nehmen diese zum überwiegenden Teil ($> 50\%$) den Lebend-Tot-Farbstoff PI auf, während keine spezifische FITC-AnV-Bindung am Spermienkopf beobachtet wurde. Auch die Gegenwart von FITC-AnV während der Akrosomreaktion führte nicht zu einer Markierung der Zellen.

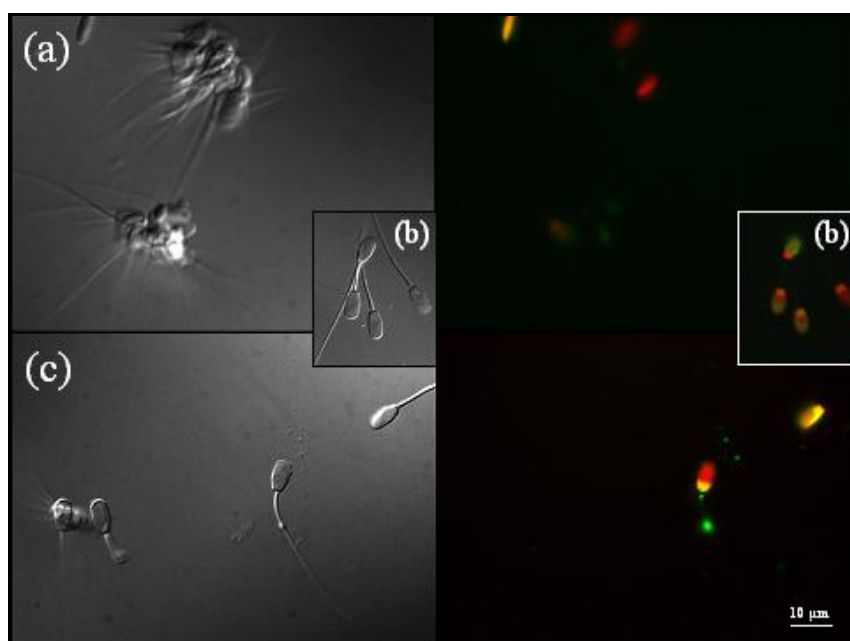


Abb. 22: FITC-AnV/PI-Markierung kapazitierter Eberspermien: Die dargestellten Mikroskopiebilder wurden bei 38,5°C aufgenommen. Die linke Bildhälfte zeigt jeweils das Phaseninterferenzbild zur morphologischen Differenzierung der Zellen, die rechte hingegen die Überlagerung von FITC- und PI-Fluoreszenzen der untersuchten Spermien. (a) Typische Zellagglutinate, in denen die Spermien zum überwiegenden Teil unmarkiert sind. (b) Bei einem Teil der PI-gefärbten Zellen, die morphologisch intakt erscheinen, bindet FITC-AnV im Bereich der Kopfkappe. (c) An Eberspermien im Schwanzbereich assoziierte Zytoplasmatropfen zeigen nur dann eine AnV-Bindung, wenn die Zelle PI aufnimmt. Bei einem vorzeitig akrosomreagierten Spermium lösen sich Membranvesikel vom apikalen Bereich der Kopfkappe. Diese binden teilweise FITC-AnV, ebenso die Becherhülle.

Lediglich im Bereich des Spermienchwanzes waren kleine FITC-AnV markierte Bereiche zu erkennen. Eine spezifische AnV-Bindung zeigten jedoch abgelöste Zytoplasmatropfen und andere vesikuläre Membranreste, charakterisiert durch ihre intensive FITC-Fluoreszenz. Abbildung 23 zeigt ein charakteristisches Bild akrosomreagierter, FITC-AnV/PI-markierter

Eberspermien. Eine Inkubation der Spermien mit Kalziumionophor (10-60 min, 3-30 μM) führte unter keiner der getesteten Bedingungen zu einer Bindung von AnV an exponiertes, endogenes PS. Weder an frisch gewaschenen noch an kurzzeitig bei 38,5°C inkubierten oder kapazitierten Eberspermien konnte ein Scrambling von PS ausgelöst werden.

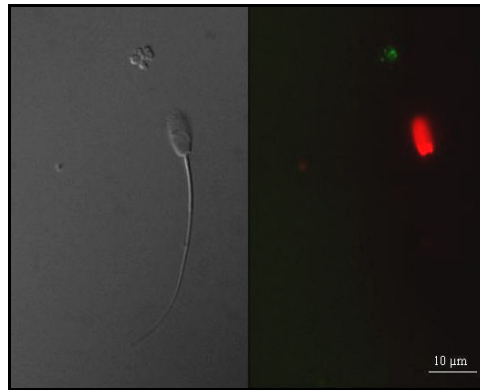


Abb. 23: FITC-AnV/PI-Markierung Akrosomreagerter Eberspermien: Das dargestellte Mikroskopiebild wurde bei 38,5°C aufgenommen. Die linke Bildhälfte zeigt das Phaseninterferenzbild zur morphologischen Differenzierung, die rechte hingegen die Überlagerung von FITC- und PI- Fluoreszenzen. Während an den Spermien keine spezifische AnV-Bindung zu erkennen ist, zeigen abgelöste vesikuläre Membranstrukturen eine FITC-Markierung.

Die mikroskopischen Untersuchungen FITC-AnV/PI markierter Eberspermien konnten die durchflusszytometrischen Ergebnisse prinzipiell bestätigen. Die Kapazitation bewirkte zwar eine Zunahme des Anteils FITC-AnV-bindender Spermien, jedoch unter Mikroskopiebedingungen ausschließlich an PI-gefärbten Zellen. Nach Zugabe des Kalziumionophor waren die AnV-Bindungsstellen im Kopfbereich nicht mehr vorhanden.

Die folgenden Versuche sollten eine bessere Differenzierung des morphologischen Zustandes der Eberspermien mit Hilfe der Fluoreszenzmarkierung funktioneller Strukturen der Spermienzelle (Mitochondrien, äußere Akrosommembran, akrosomaler Inhalt) ermöglichen.

3.3.3 Lokalisation von endogenem PS in motilen Eberspermien

Als Alternative zur PI-Färbung wurde der Mitochondrienfarbstoff R123 als Marker für motile, lebensfähige Spermien genutzt. Die Exposition von PS wurde über die Bindung von Alexa-AnV verfolgt. Die Versuche bestätigten die oben dargestellten Ergebnisse der FITC-AnV/PI-Markierungen. Spermien mit intensiver R123-Färbung der Mitochondrien erschienen morphologisch intakt und zeigten keine Alexa-AnV-Bindung am Spermienkopf. Bei einem

Teil der Eberspermien, deren R123-Fluoreszenz der Mitochondrien deutlich verringert war, konnte eine Alexa-AnV-Bindung im Bereich des Akrosoms beobachtet werden (Bilder nicht gezeigt). Wurden die Farbstoffe nicht ausgewaschen, erschienen die R123 gefärbten Mitochondrien motiler Spermien zudem intensiv rot fluoreszierend. Dies könnte zum einen auf eine Wechselwirkung zwischen R123 und Alexa-AnV zurückzuführen sein (z. B. Energieübertragung) oder R123 fluoresziert bei Grünanregung im Bereich roten Lichtes.

Dieser Versuchsansatz wurde nicht weiterverfolgt, da er einerseits keine weiteren Aussagen (im Vergleich zur FITC-AnV/PI-Markierung) ergab, andererseits ein Waschen der R123-gefärbten Spermien für ein „gutes“ Mikroskopiebild (geringe Hintergrundfluoreszenz und keine bzw. geringe unspezifische Bindung an Membranen) unabdingbar war. Wie bereits vorne erläutert, sind kapazitierte und akrosomreagierte Eberspermien sehr instabil und jeder Wasch- und Zentrifugationsschritt bedeutet erheblichen Stress für die Zellen.

3.3.4 Lokalisation von endogenem PS an morphologisch intakte und defekte Eberspermien - Lektinbindung an akrosomale Strukturen

Zur besseren Differenzierung von intakten Spermien und Spermien mit defekter Zell- und/oder Akrosommembran wurden die Lektine PSA und PNA genutzt. PSA bindet bei Eberspermien vor allem an Strukturen der akrosomalen Matrix, während die PNA-Bindung charakteristisch für die äußere Akrosommembran ist.

PSA – akrosomaler Inhalt

Eine intensive spezifische Markierung des Akrosoms mit FITC-PSA zeigten Spermien, deren Kopfkappe im Phasenkontrast expandiert, aber nicht abgelöst erschien. An diesen Spermien konnte sowohl in kapazitierten als auch in kavitierten Zellen eine Alexa-AnV-Bindung beobachtet werden. An einigen Zellen trat zudem eine FITC-PSA-Markierung von Becherhülse und Mittelstück auf. Auch diese Zellen zeigten eine Alexa-AnV-Bindung an der Kopfkappe. Die PSA-Markierung wurde für die mikroskopischen Untersuchungen nicht weiter verfolgt, da einerseits ein Auswaschen unspezifisch assoziierten Lektins nötig war und andererseits keine eindeutige morphologische Zuordnung der einzelnen Spermien getroffen werden konnte. Je nach Fortschreiten der Expansion des Akrosoms bzw. der Zugänglichkeit des akrosomalen Inhalts variierten die Fluoreszenzintensitäten z.T. beträchtlich.

PNA – äußere Akrosommembran

Die Bindung von PNA an die äußere Akrosommembran der Eberspermien erfolgte spezifisch. Lediglich die Kopfkappe membrandefekter Spermien erschien intensiv fluoreszenzmarkiert, während alle übrigen Membranen unmarkiert blieben. Im folgenden werden die Ergebnisse der Komarkierung von Eberspermien mit AnV und PNA systematisch dargestellt.

Für die Auswertungen der mikroskopischen Aufnahmen wurden die in Abbildung 24 dargestellten Spermienpopulationen unterschieden. Zunächst wurde die Morphologie im Phasenkontrast bzw. im Phaseninterferenzbild beurteilt. Spermien mit sich deutlich abzeichnendem (normalem) akrosomalem Rand (NAR) werden in der Spermatologie als morphologisch intakte Zellen bezeichnet. Sie wurden je nach Fluoreszenzmarkierung den Gruppen A-D zugeordnet. Im Phaseninterferenzbild zeichnete sich der akrosomale Rand, vor allem nach Kavitation der Eberspermien, nicht immer eindeutig ab. Wenn die Kopfkappe eindeutig vorhanden und mit glatter Oberfläche fest am Spermium assoziiert war (in Abb. 24 mit # gekennzeichnet), wurde die Zelle entsprechend ihrer Fluoreszenzeigenschaften ebenfalls einer der Gruppen A-D zugeordnet.

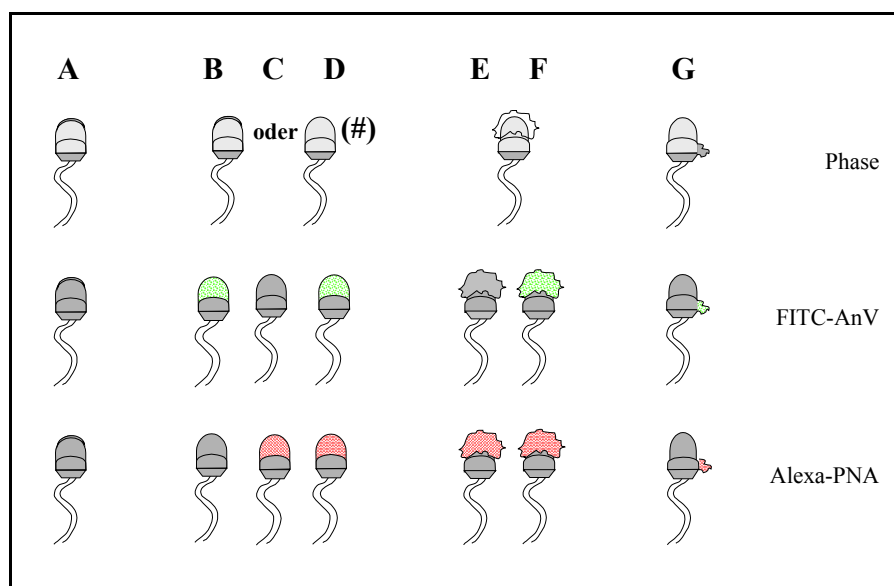


Abb. 24: Bindungsmuster von FITC-AnV und Alexa-PNA an Eberspermien: Es wurden die Kategorien A-G unterschieden. Alle mikroskopisch untersuchten Spermien wurden entsprechend ihrer Morphologie im Phasenkontrast und ihren Bindungseigenschaften für FITC-AnV und Alexa-PNA eingeteilt. Dabei wurden nur die Merkmale der Kopfkappe, nicht aber teilweise vorhandene Markierungen der Becherhülle und/oder des Schwanzes berücksichtigt.

Bei kavitierten und akrosomreagierten Spermien löste sich oft die gesamte Kopfkappe vom Spermium ab oder es waren sich ablösende Membranvesikel im Bereich des Akrosoms zu erkennen. Diese Zellen wurden der Kategorie E oder F zugeordnet. Spermien, denen die Kopfkappe vollständig fehlte, wurden in der Kategorie G erfasst. Zur Beurteilung der Bindung von AnV und PNA an die Spermien wurden nacheinander die beiden Fluoreszenzbilder aufgenommen und überlagert. Eine Markierung der Becherhülse oder des Schwanzes (nur bei toten Zellen) wurde zur besseren Übersichtlichkeit in den Kategorien A-G nicht berücksichtigt.

Frische Eberspermien

An die Mehrzahl der frischen, in TALP gewaschenen Eberspermien konnte weder AnV noch PNA binden. In einem exemplarischen Versuch waren 84% der Zellen morphologisch intakt und ohne Fluoreszenzmarkierung (Kategorie A), 15% zeigten eine PNA-Markierung mit (Kategorie D 9%) bzw. ohne (Kategorie C 6%) AnV-Bindung.

Frische, kavitierte Eberspermien

Mittels N₂-Kavitation wurde von frisch gewaschenen Eberspermien die Plasmamembran im Bereich des Akrosoms abgelöst, um die äußere Akrosommembran und abgelöste Reste der Plasmamembran bezüglich der Präsenz von PS zu untersuchen.

Tab. 11: AnV/PNA-Markierung kavittierter Eberspermien: Ausgewiesen sind die prozentualen Anteile (i) der den einzelnen Kategorien (siehe Abb.18) zugeordneten Spermien, (ii) aller AnV-bindenden Zellen ($\Sigma\text{AnV}=\text{B}+\text{D}+\text{F}$) sowie (iii) der Spermien mit AnV-Bindung an der Becherhülse (unabhängig von deren Zellmorphologie). In drei unabhängigen Versuchen wurden je 200 Zellen ausgewertet. Die untere Zeile gibt die aus den Einzelversuchen resultierenden Mittelwerte und Standardabweichungen an.

Kategorie	A	B	C	D	E	F	G	ΣAnV	AnV B-hülse
Versuch 1	5	0	6	5	2	52	29	57	12
Versuch 2	3	0	0	15	1	74	7	89	35
Versuch 3	1	0	0	24	0	70	5	94	15
MW \pm SD	3 \pm 2	0	2 \pm 4	15 \pm 9	1 \pm 1	65 \pm 12	14 \pm 13	80 \pm 20	21 \pm 13

Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche. Die gewählten Kavitationsbedingungen (45 bar, 10 min, auf Eis) führten zu einer sehr effektiven Ablösung der apikalen Plasmamembran in nahezu allen Zellen. Weniger als 5% der Spermien erschienen nach dieser Behandlung morphologisch intakt ohne eine Zugänglichkeit der äußeren Akrosommembran für PNA zu zeigen (Kategorien A/B). Ungefähr 15% der kavitierten Eberspermien waren morphologisch scheinbar intakt, zeigten aber eine intensive

AnV- und PNA-Bindung (Kategorie D#). Bei diesen Spermien wurde wahrscheinlich die apikale Plasmamembran komplett abgelöst, während das Akrosom kompakt anliegend blieb (elektronenmikroskopische Arbeiten unterstützen dies, siehe 3.3.5). Die AnV-Bindung erfolgte demnach an zytoplasmatisch exponiertes PS der äußeren Akrosommembran. Bei der Mehrzahl der kavitierten Eberspermien (Kategorie F, 65%) erschien das Akrosom vor allem am apikalen Rand expandiert. An diese Spermien konnten fast ausschließlich beide Marker binden. An welchem Monolayer, welcher Membran (PM oder äAM) die AnV-Bindung erfolgte, kann nicht entschieden werden, wahrscheinlich ist aber auch hier eine zytoplasmatische PS-Exposition auf der äußeren Akrosommembran. Durchschnittlich 14% der Zellen haben bei der Kavitation auf Eis ihre Kopfkappe komplett verloren (Kategorie G) und zeigten im akrosomalen Bereich keine Fluoreszenzmarkierung.

Es sei darauf hingewiesen, dass die Unterschiede zwischen den Einzelversuchen z.T. erheblich waren. So hatte z.B. die Kavitation auf die im ersten Versuch untersuchten Eberspermien einen deutlich stärkeren Effekt. In dieser Probe waren nach Kavitation bei 29% der Zellen die Kopfkappen komplett abgelöst. Da die Versuchsbedingungen für die untersuchten Proben gleich waren, könnte es sich hierbei um ejakulats- bzw. tierspezifische Unterschiede der Spermienstabilität handeln. Einen vergleichbaren Effekt zeigten kapazitiert/kavitierte und akrosomreagierte Spermien (siehe Tab. 13 und 14).

Kapazitierte Eberspermien

Die kapazitierten Eberspermien wurden bei 38,5°C markiert und mikroskopisch untersucht. Tabelle 12 zeigt im Überblick die Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche. Die Zellen waren hoch motil und zum überwiegenden Teil morphologisch intakt (Kategorie A-D, 97%). Die Hälfte der erfassten Zellen zeigte keine Fluoreszenzmarkierung (Kategorie A, 49%). Die Integrität der Plasmamembran dieser Spermien blieb somit während der Kapazitation erhalten. Die andere Hälfte (Kategorie B-D, 48%) zeigte eine Bindung von AnV und/oder PNA an ihrer Kopfkappe. In den meisten Fällen war eine sichere Einteilung in die Kategorien möglich (siehe unten). Eher selten (10%) traten beide Markierungen an einer Zelle kombiniert auf (Kategorie D), meist war zudem eine der beiden Fluoreszenzen (FITC, Alexa) intensiver. Insgesamt 26% der Spermien zeigten eine AnV-Bindung (Σ AnV), was in guter Übereinstimmung zu den durchflusszytometrischen Analysen ($23 \pm 11\%$, Tab. 6 bzw. 19 ± 13 , Tab. 10) steht. 16% der Spermien hatten ausschließlich AnV am Akrosom gebunden (Kategorie B), ein Zeichen für die exoplasmatische Lokalisation von PS im äußeren Monolayer der Plasmamembran. 22% zeigten eine ausschließliche PNA-Bindung.

Tab. 12: AnV/PNA-Markierung kapazitierter Eberspermien: Ausgewiesen sind die prozentualen Anteile (i) der den einzelnen Kategorien (siehe Abb.18) zugeordneten Spermien, (ii) aller AnV-bindenden Zellen ($\Sigma \text{AnV} = \text{B} + \text{D} + \text{F}$) sowie (iii) der Spermien mit AnV-Bindung an der Becherhülse (unabhängig von deren Zellmorphologie). In drei unabhängigen Versuchen wurden je 200 Zellen ausgewertet. Die untere Zeile gibt die aus den Einzelversuchen resultierenden Mittelwerte und Standardabweichungen an.

Kategorie	A	B	C	D	E	F	G	ΣAnV	AnV B-hülse
Versuch 1	41	20	24	8	0	0	7	28	14
Versuch 2	59	12	18	10	0	0	1	22	6
Versuch 3	48	16	25	11	0	0	0	27	16
MW \pm SD	49 \pm 9	16 \pm 4	22 \pm 4	10 \pm 2	0	0	3 \pm 4	26 \pm 3	12 \pm 5

Häufig war die Markierung mit PNA am apikalen Spermienkopf auch nach Tausch der Labelgruppen (Alexa-AnV, FITC-PNA), deutlich intensiver. Eine mögliche Energieübertragung zwischen den Labeln wurde daher als Ursache ausgeschlossen. Eine Konkurrenz bzw. Behinderung bei gleichzeitiger Bindung beider Marker könnte jedoch eine Rolle spielen.

Kapazitiert, kavitierte Eberspermien

Zuvor kapazitierte Eberspermien wurden kavitiert, um die äußere Akrosommembran zugänglich zu machen. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Proben werden auch hier in der Übersicht (Tab. 13) deutlich. Im ersten Versuch bewirkte die Kavitation bei 42% aller Spermien die vollständige Ablösung des Akrosoms, während in den Versuchen 2 und 3 das Akrosom lediglich in 3 bzw. 11% der Zellen abgelöst wurde. Zellen der Kategorie F waren in allen drei Proben am häufigsten vertreten (ca. 55%), jedoch zeigte sich auch hier eine große Abstufung (42-79%). Die Kategorie E war im ersten Versuch gar nicht vertreten, im dritten hingegen mit ca. 26% die zweithäufigste. Erstaunlicher Weise war in diesen Spermien die äußere Akrosommembran frei zugänglich, endogenes PS hingegen nicht!

Trotz dieser Unterschiede konnten einige charakteristische Muster bei allen drei Versuchen wiedergefunden werden. Etwa 12% der kapazitierten Spermien erschienen auch nach Kavitation morphologisch intakt, zeigten aber eine AnV-Bindung an ihrer Kopfkappe (Kategorie B). Die Kategorien C und D blieben bei allen Versuchen unbesetzt. Eine selektive Ablösung der Plasmamembran vom Spermienkopf ohne Störung der äußeren Akrosommembran war somit bei kapazitierten Eberspermien nicht möglich. Die auffällig häufige Bindung von AnV an der Becherhülse (ca. 63%) spricht zudem für eine Destabilisierung dieses Bereiches. In frisch gewaschenen, kavitierten Spermien zeigten vergleichsweise nur ca. 21%, in kapazitierten ca. 12% eine solche Markierung.

Tab. 13: AnV/PNA-Markierung kapazitierter und anschließend kavitiert Eberspermien: Ausgewiesen sind die prozentualen Anteile (i) der den einzelnen Kategorien (siehe Abb.18) zugeordneten Spermien, (ii) aller AnV-bindenden Zellen ($\Sigma \text{AnV} = \text{B} + \text{D} + \text{F}$) sowie (iii) der Spermien mit AnV-Bindung an der Becherhülle (unabhängig von deren Zellmorphologie). In drei unabhängigen Versuchen wurden je 200 Zellen ausgewertet. Die untere Zeile gibt die aus den Einzelversuchen resultierenden Mittelwerte und Standardabweichungen an.

Kategorie	A	B	C	D	E	F	G	ΣAnV	AnV B-hülse
Versuch 1	5	11	0	0	0	42	42	53	67
Versuch 2	0	10	0	0	8	79	3	89	72
Versuch 3	2	16	0	0	26	45	11	61	49
MW \pm SD	2 \pm 3	12 \pm 3	0	0	11 \pm 13	55 \pm 21	19 \pm 21	68 \pm 19	63 \pm 12

Akrosomreagierte Eberspermien

In zuvor kapazitierten Eberspermien wurde die Akrosomreaktion durch Zugabe eines Kalziumionophors ausgelöst. In drei Versuchen konnten Unterschiede zwischen den Proben sowie charakteristische Merkmale akrosomreagerter Spermien beobachtet werden. Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse im Überblick. Die Spermienproben der drei Versuche unterschieden sich deutlich in ihrer Akrosomstabilität. Die Proben enthielten zu 35/10/1% morphologisch intakte Spermien (Kategorie A-D). Spermien mit vollständig abgelöster Kopfkappe (Kategorie G) wurden zu 39/76/58% beobachtet. Die restlichen Zellen zeigten ein sich abhebendes Akrosom mit intensiver PNA-Markierung (Kategorie E). Auch in der Spermienprobe vorhandene abgelöste Kopfkappen, die formstabil erhalten blieben, zeigten eine intensive PNA-Bindung. Wie bereits im Abschnitt 3.3.2 erläutert, bestätigten die Versuche zur AnV/PNA-Markierung von akrosomreagierten Eberspermien den nahezu vollständigen Verlust des AnV-Bindungsvermögens am Spermienkopf. Eine intensive AnV-Bindung konnte hingegen an vesikulären Membranstrukturen beobachtet werden. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um abgelöste Zytoplasmotropfen und Vesikel aus der Plasmamembran und/oder äußeren Akrosommembran. Wurden akrosomreagierte Spermien kavitiert und anschließend mit AnV und PNA markiert, zeigten alle an den Spermien vorhandenen, sich ablösenden Kopfkappen eine deutliche AnV- und PNA-Bindung (Kategorie F, 29%). Die Mehrzahl der Zellen hatte die Kopfkappe vollständig verloren (Kategorie G, 69%). Nach dieser Behandlung waren auch die Becherhülsen bzw. das Äquatoralsegment der meisten Spermien durch eine AnV-Bindung charakterisiert. Eine schnelle Abkühlung der akrosomreagierten Eberspermien von 38,5°C auf 4°C ergab ein vergleichbares Ergebnis.

Tab. 14: AnV/PNA-Markierung akrosomreagerter Eberspermien: Ausgewiesen sind die prozentualen Anteile (i) der den einzelnen Kategorien (siehe Abb.18) zugeordneten Spermien, (ii) aller AnV-bindenden Zellen ($\Sigma \text{AnV} = \text{B} + \text{D} + \text{F}$) sowie (iii) der Spermien mit AnV-Bindung an der Becherhülse (unabhängig von deren Zellmorphologie). In drei unabhängigen Versuchen wurden je 200 Zellen ausgewertet. Die untere Zeile gibt die aus den Einzelversuchen resultierenden Mittelwerte und Standardabweichungen an.

Kategorie	A	B	C	D	E	F	G	ΣAnV	AnV B-hülse
Versuch 1	26	0	0	9	27	0	39	9	0
Versuch 2	10	0	0	0	14	0	76	0	17
Versuch 3	1	0	0	0	41	0	58	0	0
MW \pm SD	12 \pm 12	0	0	3 \pm 5	27 \pm 14	0	58 \pm 19	3 \pm 5	6 \pm 10

Zusammenfassend ergaben die mikroskopischen Untersuchungen AnV/PNA-markierter Eberspermien folgende Ergebnisse:

- In frischen, in TALP gewaschenen Eberspermien befindet sich PS in intakten Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran.
- Bei frischen, in TALP gewaschen Spermien befindet sich PS auf der zytoplasmatischen Seite der äußeren Akrosommembran.
- Die Kapazitation der Eberspermien bewirkt in einem Teil der morphologisch intakt erscheinenden Zellen (ca. 16%) eine Exposition von PS.
- Während die äußere Akrosommembran nach Kapazitation bzw. Akrosomreaktion in zahlreichen Spermien (32/27%) mit PNA markiert werden konnte, zeigten die meisten dieser Zellen (22/27%) keine AnV-Bindung im Bereich der Kopfkappe.
- Die Kavitation kapazitierter Eberspermien führte scheinbar nicht zur selektiven Ablösung der Plasmamembran über dem Akrosom.
- An kapazitierten und akrosomreagierten Eberspermien wurde nach anschließender Kavitation häufig (63%) eine AnV-Bindung an der Becherhülse beobachtet.
- Nach Induktion der Akrosomreaktion mit einem Kalziumionophor konnte AnV nicht an den verbleibenden Strukturen der Kopfkappe binden.
- Der Vergleich der Einzelversuche macht die große Variabilität zwischen den einzelnen Spermienproben deutlich. Während die Kopfkappen der Spermien einer Probe sehr stabil einer Kavitation oder Akrosomreaktion standhielten und fest am Spermienkopf assoziiert blieben, konnte die gleiche Behandlung in einer anderen Spermienprobe das Akrosom teilweise oder komplett ablösen.

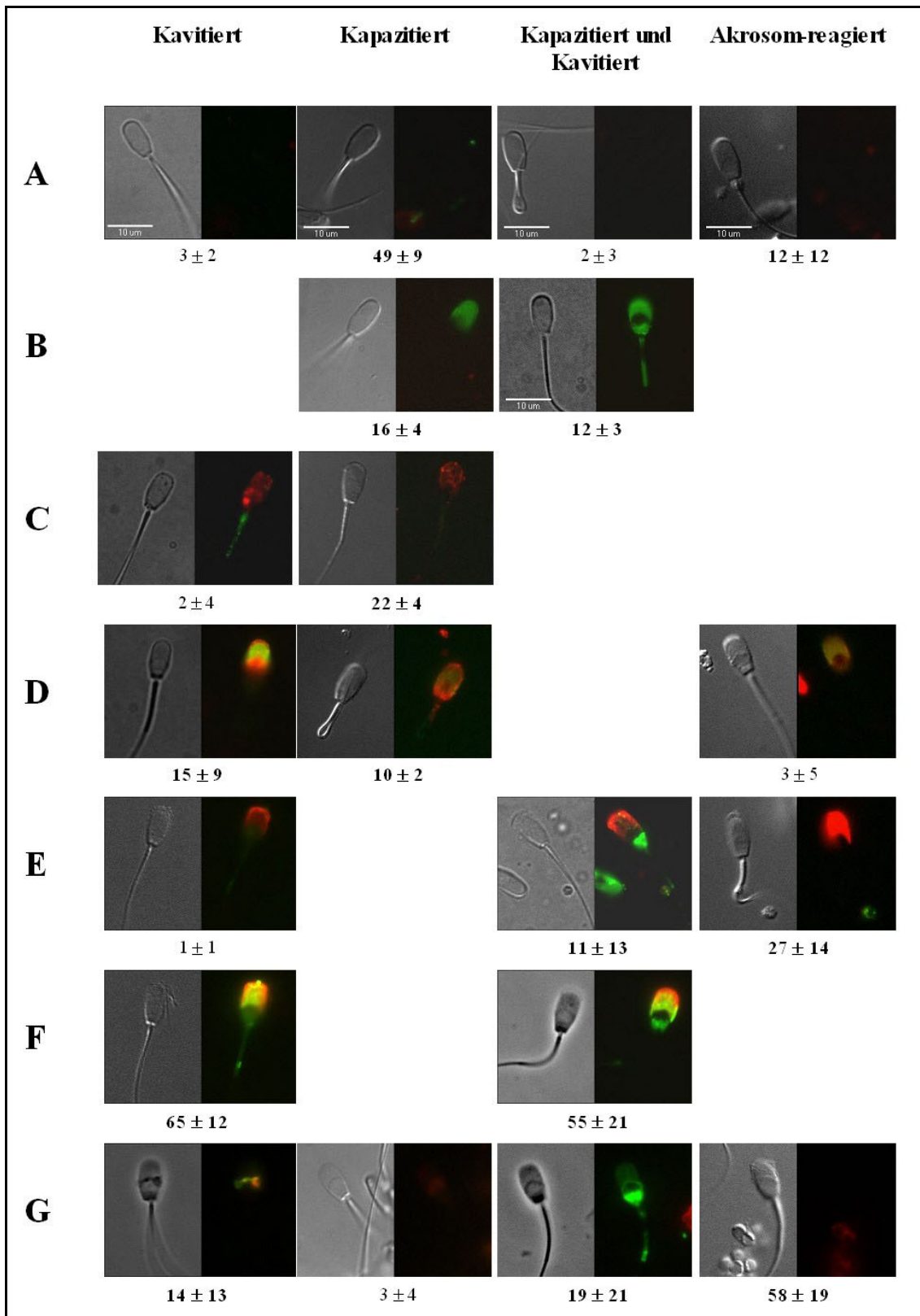


Abb. 25: Charakteristische Bindungsmuster von FITC-AnV und Alexa-PNA an Eberspermien: Die Einteilung der Kategorien A-G erfolgte entsprechend der Abb. 24 und den Erläuterungen im Text. Die linke Bildhälfte zeigt jeweils das Phaseninterferenzbild, die rechte hingegen die Überlagerung von FITC-AnV und Alexa-PNA Fluoreszenzen. Unter den Abbildungen ist die prozentuale Häufigkeit jeder Kategorie angegeben.

3.3.5 Feinstruktur der Zell- und Akrosommembran - Elektronenmikroskopie

Die morphologische Charakterisierung der Eberspermien ist trotz Phasenkontrastoptik am Lichtmikroskop nur begrenzt möglich, zumal die zu untersuchenden Membranen (PM, äAM) räumlich sehr eng benachbart sind. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie sollten die Feinstruktur von Plasmamembran und äußerer Akrosommembran, insbesondere die auftretenden Membranstörungen (z.B. Löcher, Vesikulationen, u.a.), genauer analysiert werden. Des weiteren wurde die AnV-Bindung an kapazitierten und kavitierten Eberspermien untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Zellen mit einem Biotin-AnV inkubiert und dessen Lokalisation mittels goldmarkiertem Biotin-Antikörper verfolgt.

Frische, kavitierte Eberspermien

Die Kavitation von in TALP gewaschenen Eberspermien bewirkte eine effektive Ablösung der Plasmamembran vom akrosomalen Kopfbereich. Die äußere Akrosommembran blieb teilweise eng am Spermienkopf assoziiert, die akrosomale Matrix erschien bei diesen Zellen als elektronendichte Struktur. Die Mehrzahl der Spermien zeigte eine wellenförmig expandierte äußere Akrosommembran. An der Becherhülse blieb die Plasmamembran fest mit dem Spermium assoziiert. Abbildung 26 zeigt typische Bilder kavittierter Eberspermien.

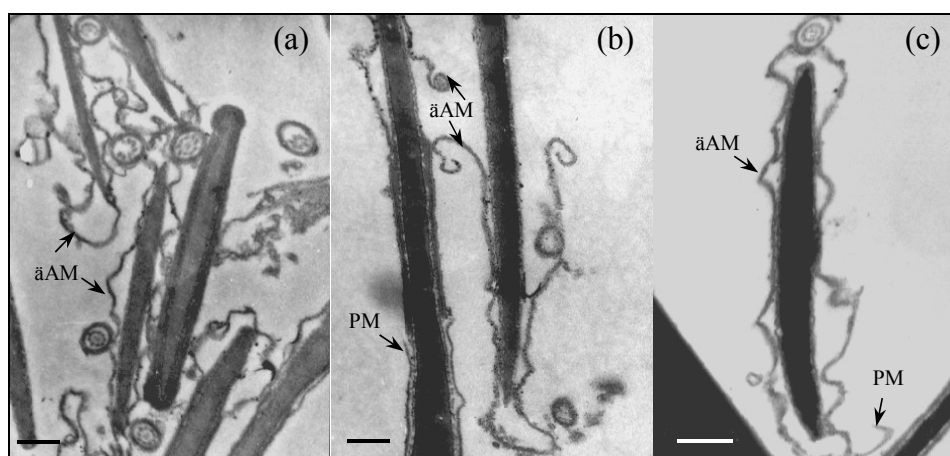


Abb. 26: Elektronenmikroskopische Aufnahme kavittierter Eberspermien: Die Länge der eingezeichneten Balken entspricht 500 nm. (a) Übersichtsbild zeigt ein Spermium mit fest assoziiertem Akrosom und mehrere mit expandierter äußerer Akrosommembran (äAM), die Plasmamembran (PM) ist jeweils vollständig abgelöst; (b) an der Becherhülse assoziierte PM und sich einrollende äußere Akrosommembran; (c) Spermium mit wellenförmig expandierter äußerer Akrosommembran und Reststruktur der abgelösten PM.

An zahlreichen kavitierten Spermien konnte eine Bindung des goldmarkierten Biotin-

Antikörpers beobachtet werden. Die Membranstruktur erschien an diesen Stellen oft sehr verschwommen, wahrscheinlich aufgrund der methodisch bedingten ungenügenden Fixierung der Membranlipide. Die Fixierung der Zellen mit Immunkarnovsky erfolgte nach Bindung des Biotin-AnV an exponiertes PS, so dass eine Vernetzung des gebundenen AnV mit anderen Membranproteinen wahrscheinlich ist. Auf ein Nachfixieren der Lipide mit Osmiumtetroxid wurde bei diesen Versuchen verzichtet, da dies die Antikörperbindung behindern könnte.

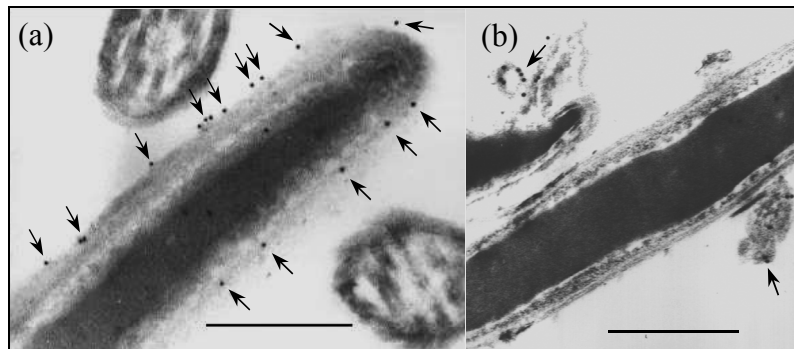


Abb. 27: AnV-Bindung an kavitierten Eberspermien: Die Länge der eingezeichneten Balken entspricht 500 nm. Die Pfeile kennzeichnen goldmarkierte Antikörper gegen Biotin-AnV (a) an der äußeren Akrosommembran, (b) an abgelösten Membranvesikeln. Das Spermium mit intakter Plasmamembran (b) zeigt hingegen keine Goldmarkierung.

Abbildung 27 zeigt zwei charakteristische Beispiele für eine AnV-Bindung an kavitierten Eberspermien. Zum einen wurde eine Markierung der äußeren Oberfläche beobachtet, zum anderen eine Bindung an vesikulären Membranstrukturen. Das Vorhandensein des akrosomalen Inhalts in Abbildung 27a spricht für die Intaktheit der äußeren Akrosommembran und somit für eine PS Exposition auf dem zytoplasmatischen Monolayer der äußeren Akrosommembran. Einige wenige Spermien wiesen in diesen Präparaten eine intakte Plasmamembran, gekennzeichnet durch einen elektronendichten Bilayer, auf. An diesen Zellen wurde nie eine Bindung goldmarkierter Antikörper beobachtet.

Kapazitierte Eberspermien

Die Kapazitation von Eberspermien bewirkte die Herausbildung morphologisch differenzierter Zellpopulationen. Abbildung 28 zeigt im Überblick einige charakteristische elektronenmikroskopische Aufnahmen kapazitierter Eberspermien. Bei der Mehrzahl der Zellen blieb der akrosomale Inhalt als elektronendichte Struktur erhalten. Nur selten wurde ein vorzeitig akrosomreagiertes Spermium mit Vesikulation der Plasmamembran und äußeren

Akrosommembran (Abb. 27e, f) beobachtet. Die Plasmamembran war entweder leicht expandiert, wellenförmig dicht der äußeren Akrosommembran überlagert oder abschnittsweise aufgelöst bzw. diffus verbreitet (Abb. 27a-d).

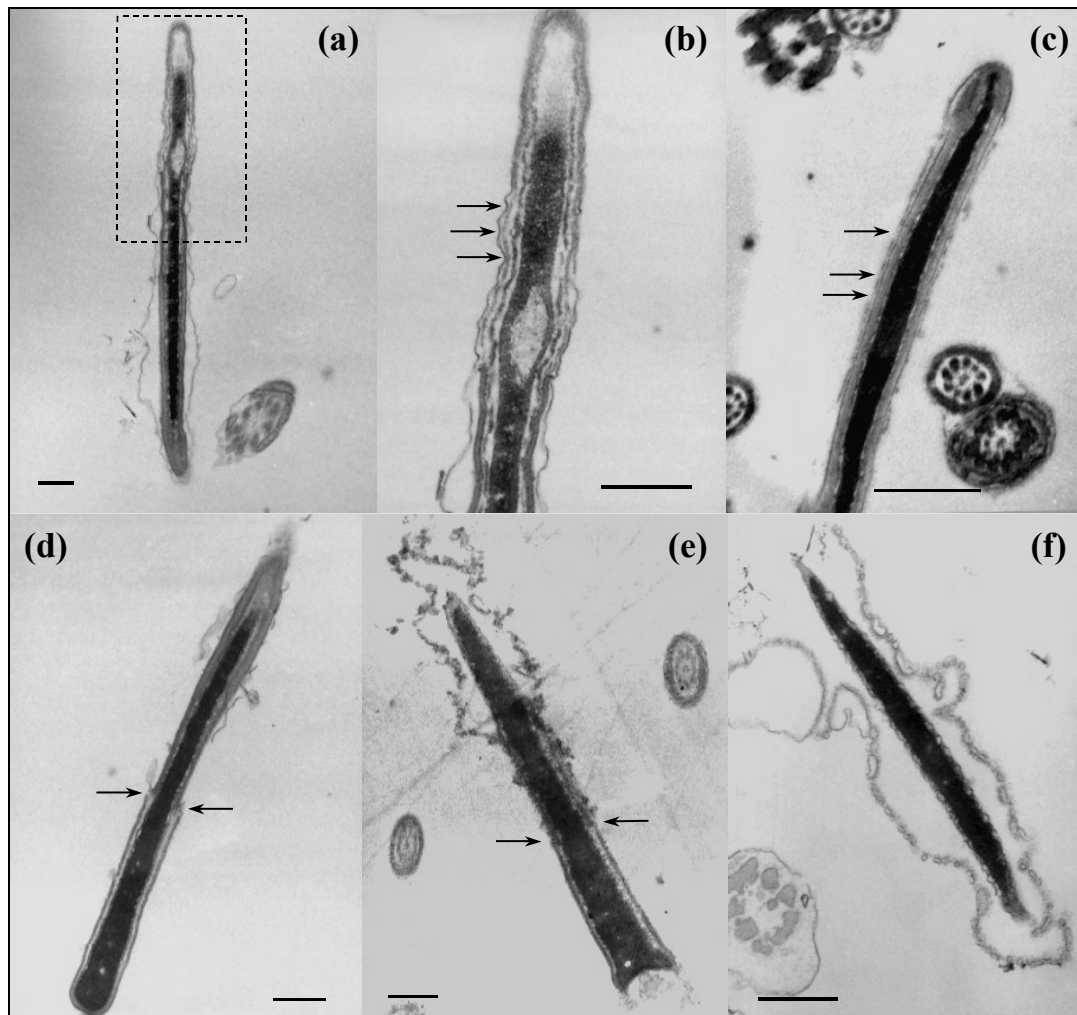


Abb. 28: Elektronenmikroskopische Aufnahme kapazitierter Eberspermien: Die Länge der eingezeichneten Balken entspricht 500 nm. Abgebildet sind charakteristische Aufnahmen kapazitierter Eberspermien: (a) Spermium mit intakter, teilweise expandierter Plasmamembran; (b) Ausschnittsvergrößerung von a), Pfeile markieren Bereiche, in denen Plasmamembran und äußere Akrosommembran eng miteinander assoziiert sind; (c) Plasmamembran ist eng mit der äußeren Akrosommembran assoziiert und weist in Abständen Löcher auf (Pfeile); (d) akrosomintaktes Spermium mit vom Kopf abgelöster Plasmamembran, Pfeile markieren Beginn der Becherhülle; (e, f) vorzeitig akrosomreagierte Spermien mit Vesikulation von Kopf und/oder äußerer Akrosommembran, Pfeile markieren Beginn der Becherhülle.

Versuche zur Markierung kapazitierter Eberspermien mit Biotin-AnV und anschließender Bindung goldmarkierter Biotin-Antikörper hatten keine intensive Markierung der Zellen zur

Folge. Lediglich vereinzelt, an wellenförmigen Membranausstülpungen oder abgelösten Membranfetzen wurden Goldpartikel in den Präparationen gefunden. Es wurde nie eine Goldmarkierung kapazitierter Eberspermien mit intakter Plasmamembran beobachtet.

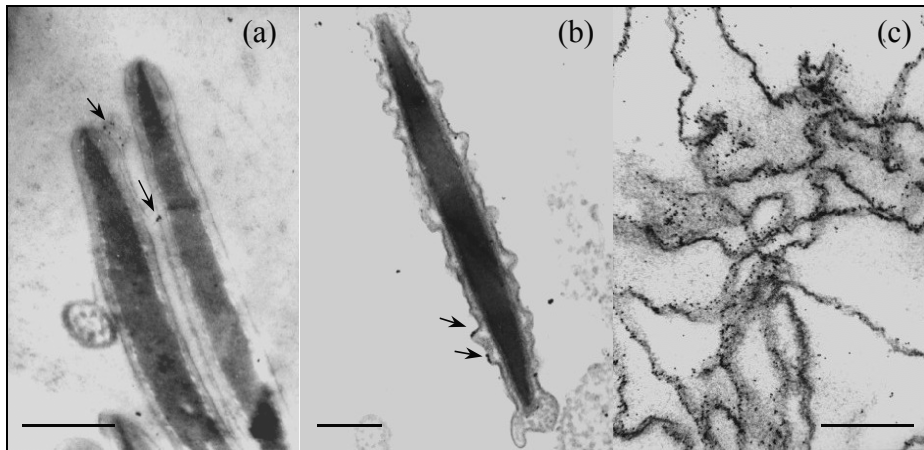


Abb. 29: AnV-Bindung an kapazitierten Eberspermien: Die Länge der eingezeichneten Balken entspricht 500 nm. Die Pfeile kennzeichnen goldmarkierte Antikörper an (a) Störstellen der Plasmamembran, (b) wellenförmigen Membranausstülpungen, (c) abgelösten Membranfetzen.

3.3.6 Zona-pellucida-Bindungsassay

Mit den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob eine bestimmte Subpopulation der kapazitierten Eberspermien (z.B. die wenigen AnV-bindenden Zellen) selektiv an isolierte Zonae binden. Dazu wurden einerseits kapazitierte, markierte Spermien mit isolierten Zonae zusammen inkubiert, andererseits sollten kapazitierte, markierte Spermien möglichst aktiv die Zonae anschwimmen.

In zwei Versuchen wurde zunächst getestet, ob flüssigkonservierte, gewaschene Spermien unspezifisch an die isolierten Zonae binden. Dies konnte in den beiden Versuchen ausgeschlossen werden. Wurden hingegen kapazitierte Spermien direkt zu den Zonae hinzugegeben und zusammen für 15 min inkubiert, waren sowohl lebende (PI-) als auch tote (PI+) Zellen mit den isolierten Eizellhüllen assoziiert, wobei es nicht zu einer Akkumulation von Spermien an den Zonae kam. Versuche zur Koinkubation zuvor AnV- und PNA-markierter, kapazitierter Eberspermien führten ebenfalls zur Bindung markierter (membrandefekter) und unmarkierter (morphologisch intakter oder akrosomreagierter) Zellen an die isolierten Zonae. In den Abbildungen 30 und 31 wird dies an charakteristischen Beispielen deutlich. Alle motilen, hyperaktivierten Spermien erschienen auch nach Bindung an die Zonae unmarkiert.

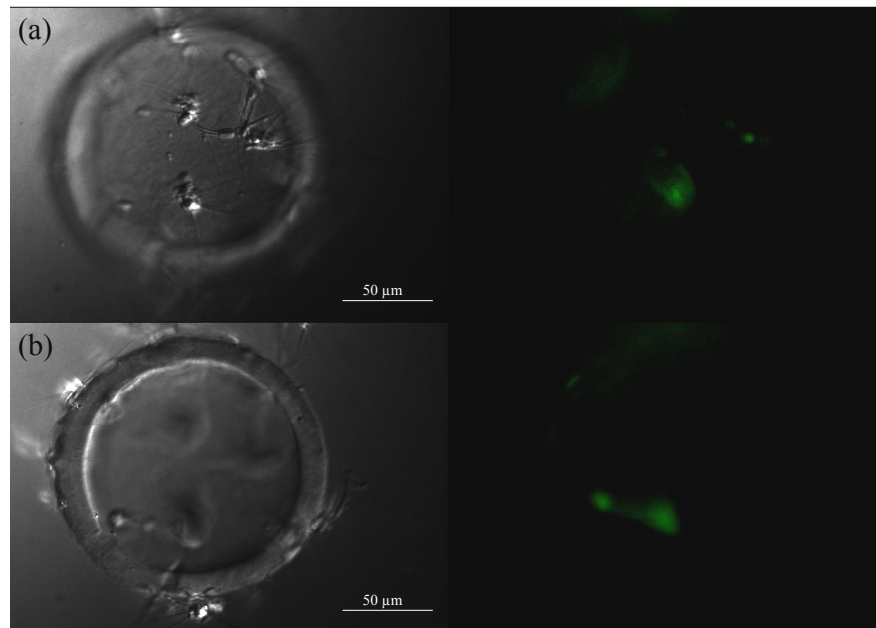


Abb. 30: Zona-pellucida-Bindungsassay: Zuvor kapazitierte und mit FITC-AnV markierte Eberspermien wurden mit isolierten Zonae für 15 min zusammen inkubiert. Im Anschluss wurden nicht gebundene Spermien durch vorsichtiges Aufsaugen der Zonae in eine mit vorgewärmten TALP gefüllte Kapillare abgetrennt, die Zonae in einen Tropfen frisches, vorgewärmtes TALP überführt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Abgebildet sind links die Phaseninterferenzbilder und rechts die Fluoreszenzbilder des FITC-AnV (grün) einer Zona in zwei Bildebenen (Aufsicht, Querschnitt).

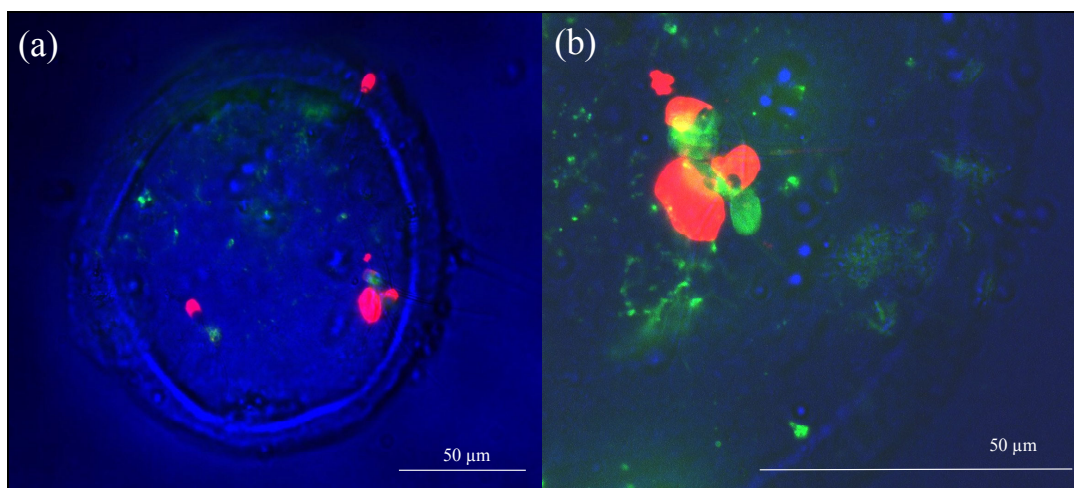


Abb. 31: Zona-pellucida-Bindungsassay: Zuvor kapazitierte und mit FITC-AnV und Alexa-PNA markierte Eberspermien wurden mit isolierten Zonae für 15 min zusammen inkubiert. Im Anschluss wurden nicht gebundene Spermien durch vorsichtiges Aufsaugen der Zonae in eine mit vorgewärmten TALP gefüllte Kapillare abgetrennt, die Zonae in einen Tropfen frisches, vorgewärmtes TALP überführt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Abgebildet ist die Überlagerung von Phaseninterferenzbild und den beiden Fluoreszenzbildern des FITC-AnV (grün) und Alexa-PNA (rot).

Da PNA-bindende Spermien vergleichsweise häufig an den Zonae gebunden waren, könnte dies für eine Auslösung der Akrosomreaktion an den Eizellhüllen sprechen, AnV-bindende Spermien waren, in Übereinstimmung mit allen bisher beschriebenen Versuchen, auch nach Koinkubation kapazitierter Zellen mit den Zonae nur selten zu beobachten. Die Morphologie der gebundenen Spermien war sowohl im Phasenkontrast als auch im Phaseninterferenzbild schwer zu beurteilen.

Versuche, die kapazitierten Spermien an die Zonae heranschwimmen zu lassen, erwiesen sich als äußerst kompliziert, da die auftretenden Kapillarkräfte stets zur Durchmischung der Proben führten. Ließ man von den zuvor kapazitierten und markierten Spermien die defekten zunächst auf dem Objektträger sedimentieren und führte anschließend den Tropfen mit den kapazitierten Eberspermien und einen zweiten mit den ebenfalls sedimentierten Zonae durch Ausziehen einer schmalen Flüssigkeitsbrücke vorsichtig zusammen, konnten nur die hoch motilen Spermien die Zonae erreichen. Nur wenige dieser generell nicht markierten Spermien wurden nach einer 15 minütigen Koinkubation an einer Zona assoziiert gefunden. Auffällig war die Bindung von wenigen Spermienaggregaten (3-10 Zellen) an ausgewählten Stellen der Zona. Selbst nach einer Stunde Inkubation waren diese Spermien noch hoch motil und fest mit der Zona assoziiert.

Die dargestellten Ergebnisse zum Zona-pellucida-Bindungsassay entsprechen Tendenzen, die aus wenigen Vorversuchen abgeleitet wurden, eine abschließende Aussage erlauben sie noch nicht. Eine passive Koinkubation kapazitierter, markierter Spermien mit isolierten Zonae ermöglichte die Bindung von toten (PI-gefärbt), membrandefekten (PNA- bzw. AnV-markiert), aber auch von intakten unmarkierten Zellen. In keinem Versuch wurde eine selektive Bindung einer bestimmten Subpopulation kapazitierter, markierter Eberspermien beobachtet. Generell unterstützen die Versuche jedoch die Aussage, dass hoch motile, kapazitierte Eberspermien, die durch aktive Bewegung zur Zona gelangen, weder durch PI noch durch PNA oder AnV markiert werden. Sie erhalten die Integrität der Plasmamembran und können an isolierte Zonae binden. Weitere Versuche würden einen hohen präparativen und methodischen Aufwand erfordern, um den Assay zu optimieren und zu standardisieren.

3.4 Untersuchungen zu lateralen Lipiddomänen in Spermienzellen - Präparation Triton-unlöslicher Membranfraktionen

Diese Versuche an Forellenspermien bildeten den Ausgangspunkt für weitere funktionelle Arbeiten zur Rolle spezifischer Lipiddomänen in Säugerspermien bei Kapazitation, Akrosomreaktion und Befruchtung. Wie in Material und Methoden erläutert, wurden Forellenspermien lysiert und das entstandene Lysat nach Abtrennung grober Zelltrümmer mittels Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt. Der Einfluss verschiedener Faktoren, wie eingesetzte Zellkonzentration bei der Lyse, Tritonkonzentration und Zentrifugationsdauer wurde untersucht. Die Versuchen hatte die Präparation von Membrandomänen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt zum Ziel. Dabei diente das jeweilige CHO/PL-Verhältnis als wesentliches Kriterium. Des weiteren wurden nach jedem Präparationsschritt die prozentualen Anteile vom ursprünglich eingesetzten Zellmaterial der Ausgangssuspension ermittelt (Wiederfindungsrate).

3.4.1 Charakterisierung der Lysate

Die Spermienkonzentration der zur Lyse eingesetzten Suspension wurde von 10^{10} über 10^9 zu 10^8 Zellen/ml erniedrigt. Als Maß für die Effizienz der Lyse wurde die Wiederfindungsrate des Cholesterols (CHO) und der Phospholipide (PL) im Überstand, nach Abtrennung der schweren Zelltrümmer (siehe Abb.5, S.50) gewählt.

Tab. 15: Lipid- und Proteingehalt von Forellenspermien: Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von n unabhängigen Einzelbestimmungen (CHO, PL: n=10; Protein: n=6).

CHO [nmol/ 10^9 Sp.]	PL [nmol/ 10^9 Sp.]	CHO/PL [mol/mol]	Proteine [mg/ 10^9 Sp.]	PL/Protein [nmol/mg]	CHO/Protein [nmol/mg]
412 ± 64	1000 ± 282	0,35 ± 0,06	1,0 ± 0,3	1428 ± 565	483 ± 153

Für die Gesamtspermien suspension wurden die in Tabelle 15 angegebenen Konzentrationen und die daraus resultierenden Verhältnisse von CHO, PL und Protein zueinander ermittelt. Verglichen mit bereits veröffentlichten Ergebnissen von kavitierten Forellenspermien liegen die Werte für das resultierende CHO/PL etwas niedriger ($0,47 \pm 0,08$), während die Werte für den absoluten Proteingehalt der Forellenspermien ($1,2 \pm 0,2$ mg/ 10^9 Spermien) sehr gut miteinander übereinstimmen [Labbé and Loir, 1991].

Bei einer Zelldichte von 10^{10} Spermien/ml konnte der überwiegende Teil der Lipide während der 20minütigen Inkubation in 1%igem Triton (Versuchsansätze A und C, siehe Abb. 32) nicht lysiert werden. Nahezu das gesamte Zellmaterial konnte durch eine Zentrifugation bei $1300\times g$ im Pellet angereichert werden. Eine Lyse in 2%igem Triton (Versuchsansätze B und D) war hinsichtlich des solubilisierten CHO (12/32% und 58/74%) etwas effektiver, wobei der massive Unterschied zwischen den beiden verwendeten Spermiesuspensionen (A/B und C/D) sich wiederholte. Hinsichtlich der Effektivität der PL-Solubilisation ergab sich zwischen den Inkubationen mit 1 oder 2%igem Triton kein wesentlicher Unterschied. Wiederholte Inkubation des Pellets in Triton führte zur weiteren Lyse der Spermienmembranen. Die schweren Zelltrümmer wurden nochmals abgetrennt und die beiden Überstände für die Ultrazentrifugation gepoolt.

Tab. 16: Effektivität der Tritonlyse von Forellenspermien: Die Lyse der Spermien erfolgte in 1%igem Triton. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Lipide im Überstand nach Abtrennung schwerer Zelltrümmer bezogen auf die eingesetzte Gesamtlipidmenge des Lysates (Wiederfindungsrate).

Versuchs- ansatz	10^{10} Zellen/ml	10^9 Zellen/ml	10^8 Zellen/ml	10^9 Zellen/ml (mit EDTA)	10^9 Zellen/ml (ohne Triton)
	A / C	E/G/I/K/N/O	F/H/J/L	Q / R	M / P
CHO [%]	12 / 58	92 ± 3	78 ± 3	47 / 76	28 / 47
PL [%]	13 / 14	77 ± 10	72 ± 14	39 / 58	21 / 24

Die Lyse von 10^9 Spermien/ml in 1%igem Triton ($n=6$) führte zu einer maximalen Solubilisierung der Lipide. $92 \pm 3\%$ des CHO und $77 \pm 10\%$ der PL wurden im Überstand angereichert. Wurde die Tritonlyse im kalziumfreien SFMM durchgeführt ($n=2$), war der Anteil CHO (47 bzw. 76%) und PL (39 bzw. 58%) im Überstand deutlich geringer. Wurden die Spermien nur durch Homogenisieren mit dem Potter zerstört ($n=2$), sank der Anteil an Lipiden, die im Überstand angereichert werden konnten, noch deutlicher ab. Lediglich 28,3 bzw. 47,1% des CHO und 21,4 bzw. 23,7% der PL gingen in Lösung. Bei diesem relativ schonenden Aufschluss von Zellen blieben die Zellorganellen wahrscheinlich weitestgehend erhalten und wurden bei der Zentrifugation mit $1300\times g$ im Pellet angereichert. Tabelle 16 zeigt zusammenfassend die prozentualen Anteile der im Überstand solubilisierten Lipide.

Eine Zellkonzentration von 10^8 Spermien/ml führte zu einer effektiven Lyse der Membranen durch 1%iges Triton. $78 \pm 3\%$ des Gesamt-CHO und $72 \pm 14\%$ der Gesamt-PL wurden im Überstand angereichert ($n=4$).

3.4.2 Charakterisierung der Membranbanden nach Ultrazentrifugation

Die Lysate aller zuvor beschriebenen Versuchsansätze wurden einem Saccharosegradienten unterschichtet und durch Ultrazentrifugation aufgetrennt. Es wurden unterschiedliche Gradienten und verschiedene Zentrifugationszeiten getestet. Die Membranfraktionen konnten über einen „kontinuierlichen“ Saccharosegradienten am besten aufgetrennt werden. Bei der verwendeten mittleren Beschleunigung von $100.000\times g$ befanden sich nach 18 h Ultrazentrifugation die obersten Banden im Bereich der 15-17,5%igen Saccharoselösung. Die jeweilige Dichte im Gradienten nach Zentrifugation wurde nicht bestimmt.

Bei den Versuchen, die eine Auftrennung der Membranfraktionen über einen diskontinuierlichen Gradienten zum Ziel hatten, waren die Banden breiter und nicht so weit im Gradienten aufgestiegen. Für das Erreichen des Gleichgewichtszustandes wäre wahrscheinlich eine längere Ultrazentrifugation nötig gewesen.

Abbildung 32 zeigt im Überblick die Ergebnisse der Ultrazentrifugationen aller Proben. Links ist jeweils der im Ultrazentrifugenröhrchen geschichtete Saccharosegradient mit dem unterschichteten Überstand der Zellyse (30 ml in 40%iger Saccharose) dargestellt, rechts hingegen die Bandenmuster nach Ultrazentrifugation. Die Banden wurden, wie in der Abbildung eingezeichnet, abgenommen und das Volumen genau bestimmt. Bei einer Ausgangskonzentration von 10^8 Zellen/ml waren keine Banden klar zu erkennen. Es wurden jene Bereiche abgesammelt, in denen bei den parallelen Versuchsansätzen mit 10^9 Zellen/ml Banden angereichert waren.

Eine deutliche Erhöhung des CHO/PL in der obersten Bande aller 18 Versuchsansätze deutet auf die Existenz einer cholesterolreichen Membranfraktion bei Forellenspermien hin. Der Proteingehalt relativ zum CHO war um das 2-30fache geringer im Vergleich zum Überstand des Lysates. Beim PL-Gehalt war die Tendenz nicht bei allen Versuchen eindeutig.

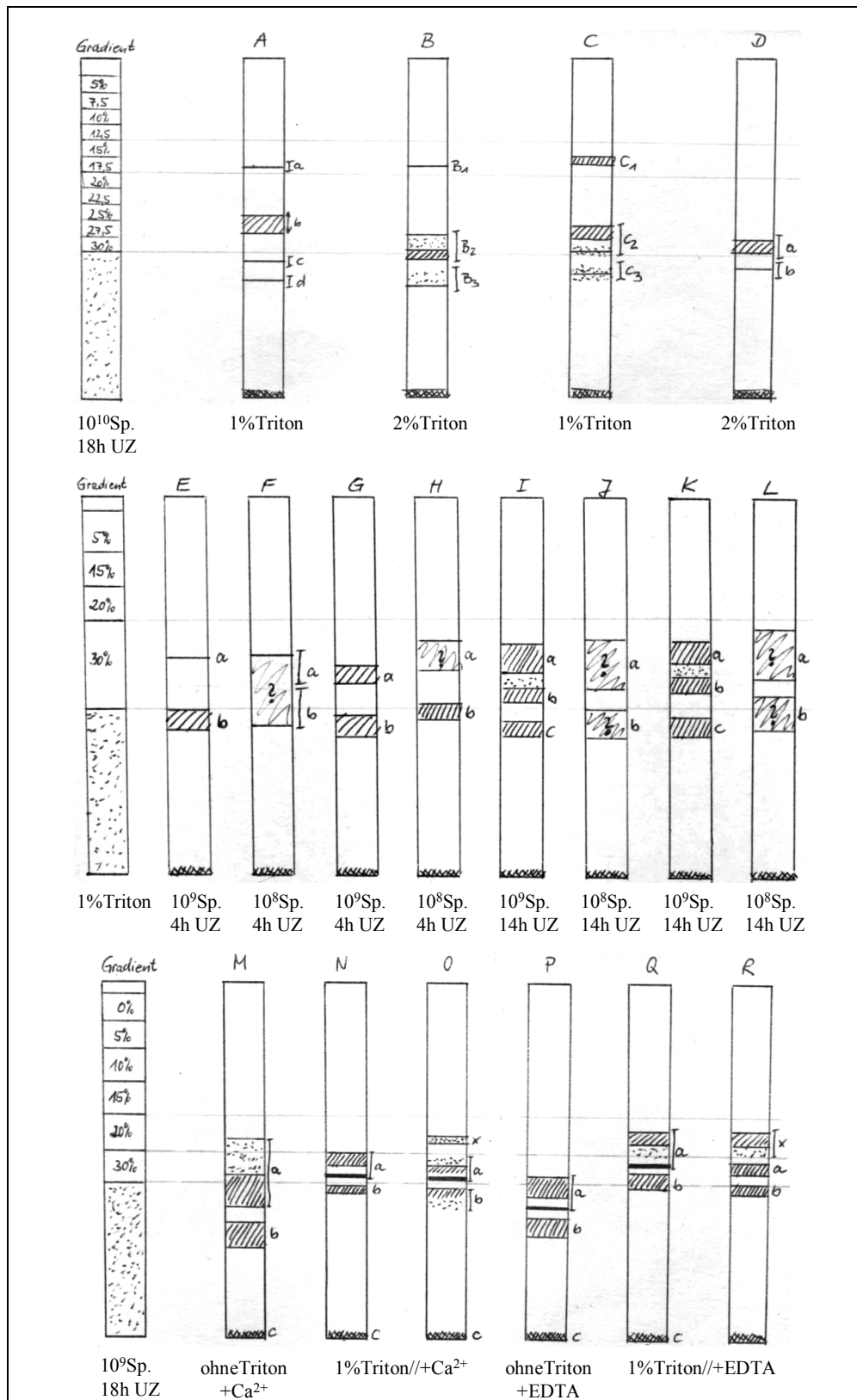


Abb. 32: Auftrennung der lysierten Membranfraktionen über eine Gradientenzentrifugation: Angegeben sind die Variationen der einzelnen Versuchsansätze (mit Ausnahme von M und P jeweils Doppelbestimmungen): Schichtung des Gradienten // eingesetzte Spermienkonzentration // Tritonkonzentration bei der Lyse // Dauer der Ultrazentrifugation (UZ) und die Bandenaufentrennungen aller durchgeführter Versuche.

Die Abbildung 33 zeigt an einem Beispiel (n=4) die Ergebnisse der Isolation einer Triton-unlöslichen Membranbande. Die Ausgangskonzentration der Forellenspermien zur Lyse in 1%igem Triton betrug jeweils 10^9 Zellen/ml (Präparationen I, K, N,O). Da die PL etwas schlechter solubilisiert wurden als das CHO, war das CHO/PL-Verhältnis im Überstand nach Abtrennung der schweren Zelltrümmer bereits leicht erhöht.

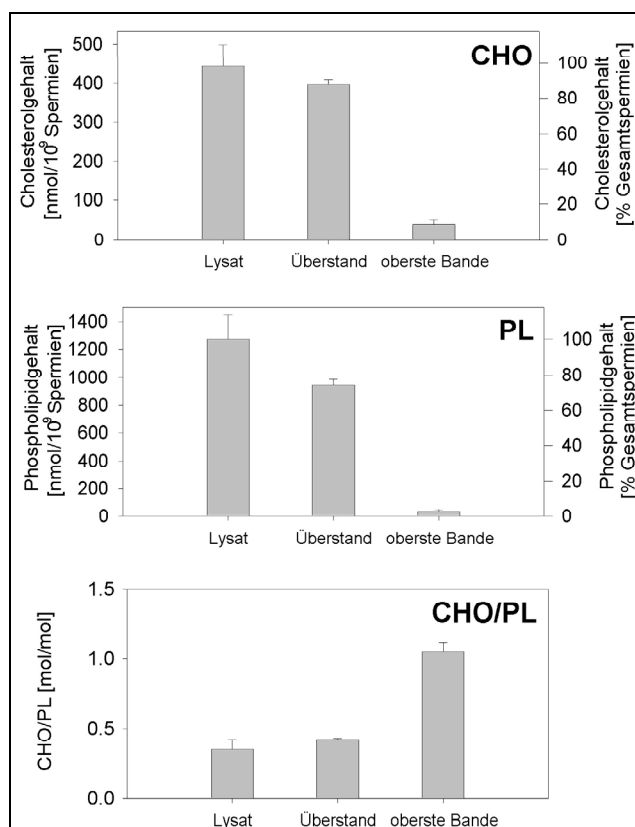


Abb. 33: Isolierung einer Membranbande geringer Dichte mit signifikant erhöhtem CHO/PL-Verhältnis. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 Versuchsansätzen. Lyse von 10^9 Zellen/ml in 1%igem Triton und anschließende Ultrazentrifugation (Präparationen I, K, N,O).

In der oberen Bande wurden ungefähr 10% (40 ± 11 nmol pro 10^9 Zellen) des CHO und 4% (37 ± 8 nmol pro 10^9 Zellen) der PL angereichert. Das CHO/PL-Verhältnis war mit $1,05 \pm 0,07$ signifikant erhöht. Der CHO- bzw. PL-Gehalt stieg im Verhältnis zum Proteingehalt ungefähr auf das Doppelte verglichen mit dem Überstand, der dem Gradienten unterschichtet wurde.

Obwohl bei allen Teilschritten exakt auf die eingesetzten Volumina geachtet wurde, konnte der Verbleib des ursprünglich im Spermienlysat vorhandenen CHO, der PL und der Proteine nicht immer eindeutig nachvollzogen werden. Am Beispiel der Versuche M-R sei dieses Problem noch einmal genauer erläutert. Die für das Gesamtspermienlysat ermittelten Werte

(100%) sollten der Summe aus den Werten des Überstandes und des Pellets nach Zentrifugation entsprechen. Für den Cholesterolgehalt stimmt dies gut überein ($95,9 \pm 19,8\%$), für den PL- ($68,7 \pm 14,0\%$) und Proteingehalt ($135,1 \pm 38,5\%$) allerdings nicht.

Setzt man nun die Werte, die für den jeweiligen Überstand ermittelt wurden, auf 100%, findet man in den Triton-unlöslichen Banden (x, a, b) und im Pellet (c) nach Ultrazentrifugation $48,9 \pm 23,3\%$ des CHO, $40,1 \pm 22,9\%$ der PL und $26,3 \pm 8,2\%$ der Proteine wieder. In den Versuchen, bei denen die Spermien ohne Triton homogenisiert wurden, lag der Anteil an CHO ($78,7\%$ bzw. $68,8\%$) und PL ($75,4\%$ bzw. $54,8\%$) in diesen Fraktionen deutlich höher.

Für die CHO- und PL-Bestimmungen wurde untersucht, ob das in den Proben anwesende Triton (0,5 bzw. 1%) oder Saccharosekonzentrationen zwischen 5-40% die Lipidanalysen stören. Tabelle 17 zeigt Ergebnisse der Lipidanalysen im Überblick.

Tab. 17: Lipidbestimmungen an Forellenspermien: Einfluss der Triton- und Saccharosekonzentration suspendierter Forellenspermien (1×10^9 Zellen/ml) auf die CHO- und PL-Bestimmungen.

Triton [%]	Saccharose [%]	CHO [nmol/ml]	PL [nmol/ml]
-	-	222	901
1,0	-	220	1140
-	40	231	1183
0,5	40	207	1236

Weder Triton noch Saccharose störten in den getesteten Konzentrationen die Lipidanalysen. Wahrscheinlich befand sich das nicht „wiedergefundene“ Material über den gesamten Gradienten verteilt.

Versuche zur Tritonlyse von Forellenspermien wurden in der Zwischenzeit im französischen Labor mehrfach wiederholt. Die oben dargestellten Ergebnisse zur Isolierung einer Membranbande geringer Dichte konnten sicher reproduziert werden. Es wurden jeweils 2-3 Triton-unlösliche Banden isoliert, deren CHO/PL ca. 1,4 betrug. Weitere Untersuchungen zur genauen Lipid- und Proteinzusammensetzung dieser Banden sind in Arbeit.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Organisation und Dynamik von Phospholipiden in der Plasmamembran und äußeren Akrosommembran von Eberspermien während der Kapazitation und Akrosomreaktion. In Analogie zur Zellmembran anderer eukaryotischer Zellen weist auch die Zellmembran von Spermien eine transversale Asymmetrie der Phospholipide auf. Diese ist durch die Anreicherung der Aminophospholipide PE und PS auf dem zytoplasmatischen Monolayer und der cholinhaltigen Phospholipide PC und SM auf dem exoplasmatischen Monolayer charakterisiert. Sie wird durch die Aktivität einer APLT aufrechtgehalten [Devaux and Zachowski, 1994; Gadella et al., 1999b; Müller et al., 1994a]. Die transversale Phospholipidasymmetrie der Zellmembran gilt als wichtige Voraussetzung für die Homöostasis einer Zelle. Veränderungen der transversalen Phospholipidverteilung haben funktionelle Konsequenzen und sind beispielsweise bei der Zellkommunikation und bei Fusionsprozessen einschließlich Endo- und Exozytose von Bedeutung. Die Kapazitation von Säugerspermien schafft die Voraussetzungen für die Entstehung fusogener Membrandomänen, an denen die Akrosomreaktion vermittelt wird [Töpfer-Petersen et al., 1996]. Der Mechanismus der Fusion zwischen Plasmamembran und äußerer Akrosommembran konnte bisher nicht geklärt werden. Um eine Beteiligung der Phospholipide an diesem Fusionsprozess sowie der nachfolgenden Bindung an die Eizellhüllen und/oder der Fusion mit der Eizellmembran zu untersuchen, wurde die transversale Lokalisation insbesondere des PS in der Plasmamembran und äußeren Akrosommembran verfolgt. PS ist mit weniger als 5mol% in den Eberspermienmembranen vertreten, wird in der Plasmamembran allerdings sehr effektiv auf dem zytoplasmatischen Monolayer akkumuliert. PS gilt sowohl als fusionsförderndes Lipid als auch als Vermittler kalziumabhängiger Wechselwirkungen der Plasmamembran mit dem Zytoskelett. Die Lokalisation von endogenem PS als ein wesentliches Kriterium der transversalen Phospholipidasymmetrie wurde in Eberspermien über eine AnnexinV-Bindung verfolgt. AnnexinV ist ein Protein, das kalziumabhängig spezifisch an PS bindet. Eine Markierung der Zellen mit NBD-PL, die als Analoga für die endogenen Phospholipide eingesetzt wurden, lieferte zudem Informationen zur Dynamik der Phospholipide in der Plasmamembran.

In lateraler Hinsicht wurde bei Spermien eine inhomogene Membranstruktur beobachtet, welche die verschiedenen Bereiche der Zelle (bei Säugerspermien: akrosomaler Bereich, Äquator, Postakrosom, Mittelstück, Schwanz) voneinander unterscheidet. Lateralen

Lipiddomänen wird in der Plasmamembran von Säugerzellen eine wesentliche Bedeutung bei der Signaltransduktion zugeschrieben [Simons and Ikonen, 1997]. Ob jedoch solche Domänen in der Zell- und Akrosommembran von Säugerspermien existieren, kapazitationsbedingt entstehen oder aufgelöst werden, wurde bisher nicht untersucht. Gerade im Hinblick auf die Prozesse, die zur Akrosomreaktion führen, sowie die Eizellerkennung erscheint dies aber von großem Interesse. In dieser Arbeit wurden erstmalig Triton-unlösliche Lipiddomänen aus Forellenspermien isoliert. Diese Spermien besitzen kein Akrosom und stellen damit ein ideales System zur experimentellen Etablierung der Assays dar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden im folgenden zu Thesen zusammengefasst und diskutiert.

Die Plasmamembran frisch ejakulierter, flüssigkonservierter Eberspermien weist eine stabile transversale Phospholipidasymmetrie auf, charakterisiert durch die Anreicherung von PS im zytoplasmatischen Monolayer. Erstmals konnte zudem eine zytoplasmatische Lokalisation von PS auf der äußeren Akrosommembran nachgewiesen werden! Somit akkumulieren die beiden einander zugewandten zytoplasmatischen Monolayer von Plasmamembran und äußeren Akrosommembran endogenes PS!

Für frisch ejakulierte Spermienzellen konnte eine stabile, transversale Phospholipidasymmetrie der Plasmamembran wiederholt nachgewiesen werden. Diese Asymmetrie beruht auf der Aktivität einer APLT, die einen schnellen Transport der Aminophospholipide PS und PE auf die zytoplasmatische Seite vermittelt [Gadella et al., 1999b; Müller et al., 1994b; Nolan et al., 1995]. Erst kürzlich beschrieben Wang et al. ein Protein in Mäusespermien, das ausschließlich im akrosomalen Bereich exprimiert wird und 62% Übereinstimmung mit der P-Typ-ATPase FIC1 aus Hepatozyten hat [Wang et al., 2004]. Letztere zeigt in der Plasmamembran von Hepatozyten die Aktivität einer APLT [Ujhazy et al., 2001]. In der vorliegenden Arbeit konnte für flüssigkonservierte Eberspermien auch nach 1-3 Tagen Lagerung eine schnelle ($t_{1/2} \sim 3\text{min}$) Translokation von NBD-PS auf die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran nachgewiesen werden. Die Auswärtsbewegung erfolgte vergleichsweise sehr langsam, so dass es zur Anreicherung von 90% des NBD-PS auf dem zytoplasmatischen Monolayer kam. In Übereinstimmung damit konnte durchflusszytometrisch an lebenden Spermien nur äußerst selten (in 1% der Zellen) eine AnV-Bindung an exponiertes, endogenes PS beobachtet werden. Etwa 4% der Spermien

zeigten eine intensive AnV-Markierung im Bereich der Kopfkappe, jedoch waren diese Zellen tot (PI-gefärbt). AnV war außerdem mit abgelösten Zytoplasmotropfen assoziiert. In den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde in keinem Experiment ein lebendes (PI-) Spermium mit AnV-Markierung beobachtet!

Zur transversalen Organisation der Phospholipide in der inneren und äußeren Akrosommembran gab es bisher keine Untersuchungen. Die Kavitation von gewaschenen Eberspermien ermöglichte jedoch eine effektive Ablösung der Plasmamembran über dem akrosomalen Bereich, so dass die äußere Akrosommembran einer Markierung mit exogenen Labeln zugänglich gemacht werden konnte. Entsprechend der Arbeiten von Peterson et al. kann bei geeigneter Wahl der Kavitationsbedingungen (45 bar) selektiv die Plasmamembran vom Spermienkopf entfernt werden, während das Akrosom an 99% der Spermien assoziiert bleibt [Peterson et al., 1980]. Die eigenen elektronenmikroskopischen Aufnahmen frischer Eberspermien nach Kavitation konnten diesen Befund bestätigen. Während die Plasmamembran über der Kopfkappe i.d.R. vollständig abgelöst war, blieb die äußere Akrosommembran überwiegend mit den Zellen assoziiert. So zeigten auch 83% der frischen, kavitierten Spermien fluoreszenzmikroskopisch die für die äußere Akrosommembran typische PNA-Markierung der Kopfkappe. In 80% der Spermien war sie kombiniert mit einer intensiven AnV-Bindung in diesem Bereich. Dieses Ergebnis spricht deutlich für eine zytoplasmatische Exposition von PS auf der äußeren Akrosommembran. Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten diesen Befund. Sowohl an der zytoplasmatischen Seite der äußeren Akrosommembran als auch an abgelösten Reststrukturen der Plasmamembran wurde eine Markierung mit goldmarkierten Biotin-Antikörpern beobachtet, nachdem die Zellen zuvor mit Biotin-AnV inkubiert worden waren. Spermien, deren Akrosom komplett abgelöst war, zeigten jedoch keine Markierung. Mit großer Wahrscheinlichkeit blieb bei diesen Zellen die innere Akrosommembran, eine sehr stabile Membran, die selbst einer Ultraschallbehandlung widersteht, über der Kernmembran erhalten [Huang and Yanagimachi, 1985]. Die Tatsache, dass AnV am akrosomalen Bereich solcher Zellen nicht binden konnte, deutet darauf hin, dass die akrosomale Seite der inneren Akrosommembran wahrscheinlich kein PS enthält. Ein spezifischer Marker, der sicher die innere Akrosommembran definiert, ist nicht bekannt.

Das Akrosom entsteht während der Genese aus dem Golgi-Apparat der Spermatiden. Morphologisch könnte es demnach als riesiges sekretorisches Vesikel angesehen werden [Tulsiani and Abou-Haila, 2004]. Eine zytoplasmatische Anreicherung des PS in der äußeren

Akrosommembran wird durch Befunde anderer Autoren unterstützt. So wird für die vom Golgi-Apparat entlassenen sekretorischen Vesikel eine asymmetrische Lipidverteilung mit Anreicherung der Aminophospholipide auf dem zytoplasmatischen Monolayer beschrieben [Holthuis et al., 2003]. Inwiefern die Aktivität einer APLT an der zytoplasmatischen PS-Lokalisation in der äußeren Akrosommembran beteiligt ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Eine selektive Abtrennung und Aufreinigung der äußeren Akrosommembran wurde in der Literatur beschrieben [Töpfer-Petersen et al., 1983; Parks et al., 1987]. Eventuell könnte die Rekonstitution der isolierten äußeren Akrosommembran künftig Aufschluss über eine vorhandene APLT-Aktivität geben.

Lebende Eberspermien sowie die Mehrheit der morphologisch intakten Spermien exponieren während der Kapazitation endogenes PS nicht auf der Zelloberfläche. Die Translokation von NBD-PS in lebenden, kapazitierten Zellen ist verlangsamt, die transversale Asymmetrie des PS in der Plasmamembran bleibt jedoch erhalten!

Zytoplasmatische Lokalisation von PS in der PM trotz verlangsamer Translokation

Generell führte die Kapazitation von Eberspermien zu einem signifikanten Anstieg des Anteils AnV-bindender Zellen. Die Mehrzahl dieser Zellen erschien allerdings in allen Proben PI-gefärbt. Somit ergab sich eine enge Korrelation zwischen dem Anteil PS exponierender Zellen, detektiert durch die Bindung von AnV, und dem Anteil PI-gefärbter Spermien.

In lebenden (PI-) Eberspermien wurde hingegen auch nach Kapazitation eine ausgeprägte transversal asymmetrische Verteilung von PS in der Zellmembran gefunden. Lediglich eine kleine Subpopulation der lebenden, kapazitierten Eberspermien (6%) zeigte in der Durchflusszytometrie eine AnV-Bindung. Mikroskopisch konnten solche Spermien nie beobachtet werden.

Ursache für die Exposition endogenen PS auf der exoplasmatischen Seite der Plasmamembran könnte zum einen die Verringerung der APLT-Aktivität sein, andererseits wäre ein gesteigerter Auswärtstransport des PS möglich. Die vom Durchflusszytometer erfassten (AnV+/PI-) Partikel könnten jedoch auch abgelösten Membranstrukturen (z.B. Zytoplasmotropfen) entsprechen, die in allen mikroskopischen Präparaten eine intensive AnV-Markierung aufwiesen. Solche Membranstrukturen sind methodisch in der Durchflusszytometrie nicht von Spermien zu separieren, da sie vergleichbare Streulichteigenschaften aufweisen.

In Untersuchungen zur Verteilung fluoreszenzmarkierter Phospholipidanaloge bewirkte die In-vitro-Kapazitation tatsächlich eine verlangsamte Translokation ($t_{1/2} \sim 4,5 \text{ min}$) des NBD-PS in lebenden Zellen. Der Anteil der zytoplasmatisch angereicherten PS-Analoga war bei allen Versuchen verringert. Im Mittel ergaben die Versuche eine signifikante Verringerung des Labelanteils von 93 % (frisch) auf 81% (kapazitiert) im inneren Monolayer der Plasmamembran. Die Translokation von NBD-PC sowie die Auswärtsbewegung der NBD-PL blieb allerdings in kapazitierten Eberspermien unverändert. Somit lag die verlangsamte Translokation des NBD-PS wahrscheinlich in einer geringeren Transportaktivität der APLT begründet. Ursache hierfür könnte z.B. eine kapazitationsbedingte erhöhte zytoplasmatische Kalziumkonzentration sein [Bever et al., 1999]. Ein Vergleich der Einzelversuche zeigte jedoch, dass die Verringerung des zytoplasmatischen Labelanteils mit der Zunahme des Anteils toter Spermien in der Probe korreliert. Damit könnte auch ein massiver ATP-Mangel in Proben weniger vitaler Spermien zur Verringerung der Aktivität der APLT führen [Müller et al., 1999]. Beide Ursachen könnten in einem Teil der kapazitierten Spermien (Vergleich Durchflusszytometrie, 6% AnV+/PI- Zellen) zunächst zu einer Exposition von PS führen, bevor die Zellen den Lebend-Tot-Farbstoff PI aufnehmen. Die Verminderung des zytoplasmatisch angereicherten NBD-PS könnte schließlich auch durch eine gesteigerte Phospholipaseaktivität in kapazitierten Spermien vorgetäuscht werden, da in den Versuchen kein Hemmstoff verwendet wurde.

Neben der Population lebender (PI-) Zellen, deren NBD-Fluoreszenz durch Dithionit moderat gelöscht werden konnte, ergaben die durchflusszytometrischen Versuche NBD-PS/PI markierter Spermien einen erheblichen Anteil (kapazitiert 24%) PI-ungefärbter Partikel, deren NBD-Fluoreszenz mit Dithionit komplett gelöscht werden konnte. Würde es sich bei diesen Partikeln um lebende Spermien mit Lipidscrambling handeln, sollte allerdings auch eine AnV-Markierung der Zellen möglich sein, was durchflusszytometrisch lediglich für 6% der Spermien zutraf. Aus diesem Grund erscheinen die folgenden Erklärungen wahrscheinlicher als ein Scrambling der Phospholipide in lebenden Eberspermien.

So könnte die Plasmamembran einiger kapazitierter Spermien den selektiven Durchtritt von Dithionit gestatten. Ein Eintritt von Dithionit ins Zellinnere wurde für die Erythrozytenmembran gezeigt und wird, besonders intensiv bei hoher Temperatur (37°C), durch die Aktivität eines Anionentransporters (Bande 3-Protein, Cl^-/Cl^- ; $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) vermittelt [Pomorski et al., 1994]. Da es während der Kapazitation (beim Eber bei $38,5^\circ\text{C}$) zu einem Anstieg der Ionenpermeabilität der Plasmamembran kommt, wäre ein verstärkter

Eintritt von Dithionit denkbar. Diese Theorie konnte aber bisher nicht bewiesen werden, da eine Hemmung des Bande 3-Proteins zwar mit DIDS möglich ist, in Bullenspermien allerdings auch deren Kapazitation blockierte [Spira and Breitbart, 1992]. Wiederum könnte eine starke Hydrolyse des NBD-PS die Reduktion zahlreicher NBD-Gruppen von frei diffundierenden Fettsäuren erklären. So wurde für Eberspermien eine massive Hydrolyse (~65%) von NBD-PS während einer zweistündigen In-vitro-Kapazitation beobachtet [Gadella et al., 1999b].

Wie bei der AnV/PI-Markierung deuten auch die mikroskopischen Untersuchungen NBD-PS markierter Eberspermien darauf hin, dass es sich bei einem Teil der durchflusszytometrisch erfassten Partikel um abgelöste Membranstrukturen handeln könnte, in die sich die Phospholipidanaloga ebenfalls einbauen. Durch Zusammenlagerungen von Zytoplasmotropfen und Membranresten abgelöster Kopfkappen könnten Aggregate entstanden sein, deren Streulichteigenschaften sich mit denen der Spermienzellen überlagern. Somit ist eine Unterscheidung der durchflusszytometrisch erfassten Partikel bzw. Spermien nicht exakt möglich. Es ist wiederum auch nicht anzunehmen, dass 24% der durchflusszytometrisch erfassten Partikel keinen Spermienzellen entsprechen. Die mikroskopischen Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf lebende Spermien mit einer NBD-PS-Lokalisation auf dem exoplasmatischen Monolayer der Plasmamembran, da die Zugabe von Dithionit in allen NBD-PS/PI-gefärbten Zellen und in den meisten nichtzellulären Membranresten zur Reduktion der NBD-Gruppen führte. In PI-ungefärbten Spermien und einigen geschlossenen Membranvesikeln blieb die NBD-Fluoreszenz jedoch erhalten. Es besteht somit ein Widerspruch zwischen den Ergebnissen der Durchflusszytometrie und der Mikroskopie.

Es wäre durchaus möglich, dass ein Teil der sehr fragilen, kapazitierten Eberspermien unter den Bedingungen der Mikroskopie PI-gefärbt erscheint, während sie unter den Bedingungen der Durchflusszytometrie den Lebend-Tot-Farbstoff nicht aufnehmen. Demnach müssten vor allem Eberspermien mit einer stark verminderten APLT-Aktivität einen verstärkten Dithioniteintritt und/oder eine erhöhte Phospholipaseaktivität aufweisen und mikroskopisch in allen Proben PI-gefärbt sein. Da aber die Mehrzahl der Zellen während der Mikroskopie hoch motil und PI-ungefärbt war, ermöglicht PI prinzipiell auch unter den Bedingungen der Mikroskopie eine Differenzierung lebender und toter Spermien, wahrscheinlich mit verschobenen Grenzen im Vergleich zur Durchflusszytometrie.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen unter Berücksichtigung der Morphologie von

Plasmamembran und äußerer Akrosommembran (Lektinbindung/NAR) ergaben einen nicht zu vernachlässigenden Anteil (16%) morphologisch intakt erscheinender Zellen mit AnV-Bindung an der Kopfkappe ohne Zugänglichkeit der äußeren Akrosommembran für PNA. Demzufolge kann eine transversale Umverteilung der Plasmamembranphospholipide bei diesen Spermien nicht ausgeschlossen werden. Aus dieser Population könnten sich neben losen Membranresten und Zytoplasmatropfen die wenigen durchflusszytometrisch bestimmten PI-negativen Ereignisse erklären, die eine AnV-Bindung aufwiesen. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen kapazitierter Eberspermien erschien die Plasmamembran häufig mit zahlreichen wellenförmigen Ausstülpungen, an denen teilweise eine Biotin-AnV-Markierung beobachtet wurde. Eine ebenfalls beobachtete Struktur war die Ausbildung sehr kleiner, gleichförmiger Plasmamembranvesikel, die eng miteinander assoziiert waren. Über die Bildung kleiner gleichförmiger Vesikel bei spontan ablaufender Akrosomreaktion wurde bereits berichtet [Watson et al., 1992]. Beide Veränderungen der Membranstruktur könnten eine Folge des Scrambling von Phospholipiden in der Plasmamembran sein, entsprechen aber nicht der klassischen Vorstellung der induzierten Akrosomreaktion, bei der es punktuell zur Fusion von Plasmamembran und äußerer Akrosommembran kommt. Dennoch könnten auch diese Spermien in-vivo von Bedeutung sein. Die Auflösung der Hyaluronsäurematrix zwischen den Kumuluszellen erfolgt wahrscheinlich durch die von vorzeitig akrosomreagierten Spermien entlassenen akrosomalen Enzyme (Hyaluronidase). Im Gegensatz zur Bindung an die Zona pellucida erfolgt die Assoziation von Spermien an die Kumuluszellen weder artspezifisch noch proteinvermittelt. Insofern könnte ein Scrambling der Plasmamembranphospholipide in einer kleinen Population der kapazitierten Eberspermien eine Alternative oder Ergänzung zur klassischen Akrosomreaktion darstellen. Es wäre durchaus vorstellbar, dass genau diese Spermien besonders fragil sind und daher mikroskopisch bereits PI-gefärbt erscheinen, während sie unter den Bedingungen der Durchflusszytometrie den Lebend-Tot-Farbstoff noch ausschließen.

Die Tatsache, dass nicht alle PI-gefärbten Spermien eine Bindung von AnV an exponiertes PS aufwiesen, könnte zum einen dem sehr langsamen passiven Flop der Phospholipide über die Plasmamembran geschuldet sein. Andererseits wurde wiederholt gezeigt, dass Membranen, deren Integrität massiv gestört war, kein AnV binden. Dies könnte mit einem Verlust von PS aus der Membran oder einer extremen Abnahme der Fluidität der Membran zusammenhängen [Rimon et al., 1997; Vincent and Maiese, 1999]. Arbeiten zur lateralen Diffusion von

Fluoreszenzmarkern zeigten, dass die Plasmamembran toter Bullenspermien sehr rigide ist [Ladha et al., 1997]. Da in jeder Spermien suspension kapazitierter Zellen ein Anteil vorzeitig akrosomreagerter Spermien enthalten ist, kann es sich bei den PI-gefärbten Zellen ohne AnV-Bindung jedoch auch um defekte Zellen handeln, deren Plasmamembran und äußere Akrosommembran vollständig abgelöst war. An den verbleibenden zellulären Strukturen wurde nie eine PS-Exposition beobachtet.

→ *Schlussfolgerung*

Die Ergebnisse sprechen für den Erhalt der transversalen Asymmetrie in lebenden Eberspermien während der Kapazitation. Bei dem durchflusszytometrisch erfassten Anteil an (PI-)Partikeln mit Zugänglichkeit des endogenen PS für AnV bzw. von NBD-PS für Dithionit sollte es sich entsprechend der mikroskopischen Untersuchungen um abgelöste Membranstrukturen oder besonders fragile Spermien handeln, die unter den Bedingungen der Mikroskopie bereits tot erscheinen. Eine Korrelation von PI-Färbung und PS-Exposition wurde in zweierlei Hinsicht gefunden. Zum einen nahm der prozentuale Anteil zytoplasmatisch lokalisierten NBD-PS in lebenden Zellen mit Anstieg des Anteils PI-gefärbter Zellen in der Probe ab. Wahrscheinlich war die allgemeine Fitness dieser Zellen bzw. die Aktivität ihrer APLT, eventuell durch ATP-Mangel und/oder Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, in den Proben kapazitierter Eberspermien bereits herabgesetzt. Zum anderen zeigten die Untersuchungen zur AnV/PI-Markierung kapazitierter Eberspermien einen Anstieg des Anteils AnV-bindender Zellen korreliert mit dem Anstieg des Anteils PI-gefärbter Spermien. Beides unterstützt die Theorie, dass eine PS-Lokalisation im exoplasmatischen Monolayer der Plasmamembran eher ein Zeichen des Absterbens der Zellen, als eine notwendige Voraussetzung für Akrosomreaktion oder Eizellbindung ist.

Einordnung in die Literatur und Diskussion der Konzepte anderer Autoren

Zur transversalen Phospholipidorganisation in kapazitierten Spermien gibt es bisher nur wenige Arbeiten. Seit einigen Jahren wird ein Scrambling der Phospholipide in der Plasmamembran diskutiert. Ausgangspunkt dafür waren zum einen elektronenmikroskopische Arbeiten, die eine Zunahme von anionischen Lipiden im apikalen Kopfbereich kapazitierter Zellen fanden, zum anderen Untersuchungen zur Merocyanin (M540)-Markierung kapazitierter Spermien [Bearer and Friend, 1982; Harrison et al., 1996]. Für kapazitierte Meerschweinspermien wurde die Synthese und Anreicherung von Cardiolipin und Phosphatidsäure nachgewiesen [Bearer and Friend, 1982]. Des Weiteren wurden bisher die

Aktivierung einer kalziumabhängigen Phospholipase und der Entzug von Cholesterol als Ursache für die Zunahme der Fluidität der Plasmamembran im akrosomalen Bereich des Spermienkopfes und Voraussetzung für die Akrosomreaktion intensiv diskutiert [Langlais and Roberts, 1985]. Ein Scrambling der Phospholipide würde sowohl zur Zunahme anionischer Lipide auf der exoplasmatischen Seite der Plasmamembran führen, könnte zugleich aber auch deren Fluidität erhöhen. Aus diesem Blickwinkel erscheint ein Scrambling der Phospholipide als Ursache für die Destabilisierung der Plasmamembran kapazitierter Spermien als eine interessante Hypothese.

Merocyanin (M540) wird u.a. als Marker für Änderungen der Lipidpackungsdichte in der Membran (bevorzugt Bereiche geringer Lipidordnung) verwendet [Williamson et al., 1983]. Einige Autoren nutzen M540 als „Kapazitationsmarker“ für Säugerspermien, da es während der Inkubation der Spermien zu einem sprunghaften Anstieg der Fluoreszenzintensität des M540 in einem Teil der Zellen kommt [Green and Watson, 2001; Harrison et al., 1996]. In Eberspermien ist der sprunghafte Anstieg der M540-Fluoreszenz innerhalb weniger Minuten an die Temperatur ($>37^{\circ}\text{C}$) und Anwesenheit von Bikarbonat im Medium gebunden, erfolgt aber unabhängig von BSA und Kalzium (EGTA) [Harrison et al., 1996]. Unter der Annahme, dass M540 in intakten Spermien lediglich den exoplasmatischen Monolayer der Plasmamembran markiert, soll der Anstieg der Fluoreszenzintensität des M540 in diesen Spermien die zunehmende Fluidisierung des Monolayers charakterisieren. Dies wurde in direkten Zusammenhang mit einer transversalen Umverteilung der Phospholipide in der Plasmamembran gebracht [Gadella and Harrison, 2000, 2002; Harrison and Miller, 2000]. Eine Trennung der kapazitierten Eberspermien entsprechend ihrer M540-Fluoreszenz ergab, dass Zellen mit intensiver M540-Markierung einen deutlich geringeren Cholesterolanteil in der apikalen Kopfplasmamembran aufwiesen [Flesch et al., 2001]. Die Autoren schlugen ein Modell vor, wonach die Bikarbonat induzierte Umverteilung der Membranlipide (Scrambling, Raftbildung) einen Cholesterolentzug und damit verbunden eine weitere Destabilisierung in Vorbereitung auf die Akrosomreaktion ermöglicht [Flesch et al., 2001]. Es wurde für kapazitierte Säugerspermien jedoch nie nachgewiesen, dass sich M540 tatsächlich nur in den äußeren Monolayer der Plasmamembran einbaut. Schlegel et al. nutzten M540 z.B. als Marker für die transversale Asymmetrie der Phospholipide in der Plasmamembran von Erythrozyten, nachdem sie dessen Fluoreszenz selektiv im äußeren Monolayer löschten [Schlegel et al., 1987]. Watala et al. zeigten weiterhin für Erythrozyten, dass eine Exposition von PS auf dem äußeren Monolayer zu einer Verringerung des Einbaus von M540 aufgrund

der Zunahme der negativen Oberflächenladungen führt [Watala et al., 2002]. Auch für Spermien erscheint ein direkter Zusammenhang zwischen M540-Markierung und einem Scrambling der Phospholipide in Auswertung der Arbeit von Wang et al. sehr unwahrscheinlich. Spermien mit einer reduzierten Expression einer APLT zeigten zwar eine deutliche AnV-Bindung, jedoch keine intensive M540-Markierung [Wang et al., 2004].

Die eigenen Versuchsergebnisse stehen, zumindest teilweise, im Widerspruch zu den Arbeiten, die ein kapazitationsbedingtes Scrambling der Phospholipide in der Zellmembran von lebenden (PI-) Eberspermien beschreiben [Gadella and Harrison, 2000, 2002]. Ein massives Scrambling der Plasmamembranphospholipide, charakterisiert durch eine extrazelluläre Lokalisation von PS in lebenden Eberspermien, konnte als typisches Ereignis der Kapazitation und Voraussetzung für die Fusogenität der Membran nicht bestätigt werden. In Analogie zur vorliegenden Arbeit fanden Gadella et al. eine verlangsamte Translokation von NBD-PS zur zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran in kapazitierten Spermien ($t_{1/2}$ ca. 4 min \rightarrow ca. 12 min), jedoch ohne Änderung der Gleichgewichtsverteilung dieses Labels (97% innen). Gleichzeitig war die Auswärtsbewegung des NBD-PS nach Kapazitation stark beschleunigt ($t_{1/2}$ Stunden \rightarrow ca. 12 min). Innerhalb von einer Stunde gelangten 40% des zunächst zytoplasmatisch akkumulierten Labels auf die Zelloberfläche und konnten mit BSA extrahiert werden [Gadella and Harrison, 2000]. Die Aufrechterhaltung der asymmetrischen PS-Verteilung ist unter diesen Bedingungen jedoch theoretisch nicht zu erklären, wenn man Wechselwirkungen der Aminophospholipide mit anderen Zellkompartimenten ausschließt. Eine Exposition von endogenem PS und PE auf dem äußeren Monolayer der Plasmamembran nach Kapazitation der Eberspermien wurde von den gleichen Autoren zwei Jahre später beschrieben [Gadella and Harrison, 2002]. Während PE bereits nach 10 min in 25-75% der intakten (PI- und PNA-, siehe unten) Zellen für ein PE-spezifisches Peptid zugänglich wurde, konnte eine vergleichbare AnV-Bindung erst nach 60 min in 35-85% der Zellen nachgewiesen werden. (In den eigenen Versuchen wurde eine massive AnV-Bindung an einer vergleichbar großen Population nie gefunden!) Die Autoren diskutieren, dass die hohe Affinität der APLT für PS die im Vergleich zu PE langsamere Exposition dieses Aminophospholipids erklären könnte. Parallel zur Zugänglichkeit des PE stieg nach 10 min Kapazitation der Eberspermien die M540-Markierung in 20-75% der lebenden Zellen an. Sollte M540 tatsächlich ein Scrambling der Plasmamembranphospholipide anzeigen, was innerhalb weniger Minuten zu einer Gleichverteilung der Phospholipide führt, müsste die

APLT mit hoher und nicht mit verminderter Aktivität weiter arbeiten, so dass PS trotz Scrambling nur allmählich nach außen gelangt. Eine starke Wechselwirkung von PS mit dem Zytoskelett könnte die exoplasmatische Lokalisation von PS allerdings verzögern, was wiederum eine physiologische Bedeutung der zytoplasmatischen Lokalisation des PS auch in kapazitierten Eberspermien nahe legt. Eine Wechselwirkung von PS mit dem Zytoskelett würde eventuell auch eine genauere Differenzierung der AnV-Bindung an endogenes PS und der Lokalisation des NBD-PS erfordern.

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit erfolgte die Unterscheidung zwischen intakten und defekten Zellen grundsätzlich mit einer Kombination aus Lebend-Tot-Färbung mit PI und einer Markierung der äußeren Akrosommembran mit einem ebenfalls rot fluoreszierenden PNA. Für die Versuche mit NBD-markierten Phospholipiden wurde mit 3,7 μM PI und 25 μM PNA gearbeitet, während für die Versuche zur Exposition von endogenen Phospholipiden deutlich geringere Markerkonzentrationen (PI 1,5 μM ; PNA 2,5 μM) eingesetzt wurden. In Auswertung der vorliegenden Versuche zur Optimierung der PI-Färbung kapazitierter Eberspermien könnte sich somit zumindest ein Teil der widersprüchlichen Ergebnisse erklären. Mit zunehmender PI-Konzentration stieg auch der Anteil PI-gefärbter Spermien nach Kapazitation an. Dieser Effekt ließ sich jedoch in den verwendeten Konzentrationen nicht auf eine zytotoxische Wirkung des PI zurückführen, da sich jeweils ein Plateau für den prozentualen Anteil lebender Spermien einstellte. Vielmehr schienen die kapazitierten Eberspermien in unterschiedlichem Ausmaß fragil und entsprechend unterschiedlich empfindlich für PI zu sein. Die in der eigenen Arbeit genutzten PI-Konzentrationen lagen zwischen 2 und 6 μM und führten in allen Versuchen zur Abgrenzung einer stabilen PI-ungefärbten Spermienpopulation. Durchflusszytometrisch konnte diese erst oberhalb eines Schwellwertes für die PI-Konzentration detektiert werden. Dabei mussten sowohl die PI-Konzentration, bezogen auf die eingesetzte Zellzahl, als auch das Suspensionsvolumen berücksichtigt werden. Wurden Spermien beispielsweise zunächst in hoher Konzentration gefärbt und anschließend mehrere Minuten in der zur Durchflusszytometrie nötigen Verdünnung inkubiert, wurde ein Auswaschen des PI-Farbstoffes beobachtet. Eine Trennung der PI-gefärbten Population war dann nicht mehr eindeutig möglich. Die Arbeiten von Gadella et al. enthalten keine ausreichenden Angaben, die eine Einschätzung dieser kritischen Parameter erlauben, zumal die PI-Fluoreszenz in allen durchflusszytometrischen Messungen von der PNA-Markierung überlagert wird.

Untersuchungen an epididymalen Mäusespermien ergaben, vergleichbar mit den eigenen

Ergebnissen an Eberspermien, nur einen mäßigen kapazitationsbedingten Anstieg der AnV-Bindung. Etwa 24% der kapazitierten Mäusespermien zeigten durchflusszytometrisch eine intensive AnV-Bindung, 13% erschienen mit PI gefärbt [Ávalos-Rodríguez et al., 2004].

Die oben erläuterten Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Gadella, Harrison und Flesch postulieren eine Bikarbonat-induzierte Modifikation der Lipidorganisation der Plasmamembran von Eberspermien, die wahrscheinlich über einen cAMP-abhängigen Proteinphosphorylierungs-Signalweg unter Beteiligung der PKA erfolgt und von extrazellulärem Kalzium unabhängig ist [Flesch et al., 2001; Gadella and Harrison, 2000, 2002; Harrison et al., 1996]. Ein massives Scrambling der Phospholipide, charakterisiert durch eine extrazelluläre Lokalisation von PS in lebenden Eberspermien, konnte in der eigenen Arbeit nicht bestätigt werden. Auch die Zugabe eines Kalziumionophors (3-30 μM) in Anwesenheit von extrazellulärem Kalzium (2mM) – ein klassisches Scrambling-Experiment – hatte zu keinem Zeitpunkt der Genese eine transversale Umverteilung von endogenem PS auf die exoplasmatische Seite der Plasmamembran zur Folge. Für andere tierische Zellen wurde das Scrambling von Phospholipiden generell als kalziumabhängiger Prozess beschrieben, dessen Aktivierung über eine PKC erfolgt [Bever et al., 1999; Kamp et al., 2001; Sims and Wiedmer, 2001]. Demnach müsste das in kapazitierten Eberspermien beobachtete Scrambling über einen anderen Signalweg aktiviert werden.

Die Beteiligung einer Floppase oder eines MDR-Proteins an der Auswärtsbewegung der endogenen Phospholipide kann nicht ausgeschlossen werden [Sims and Wiedmer, 2001]. In Bezug auf die Kapazitation von Säugerspermien, in deren Verlauf es zu einem selektiven Entzug von Cholesterol aus der Kopfplasmamembran kommen soll, erscheinen bestimmte ABC-Transporter besonders interessant. (Der Mechanismus des Cholesterolentzugs konnte bisher nicht geklärt werden. Eine Beteiligung lipidbindender Proteine des extrazellulären Mediums wurde wiederholt nachgewiesen, kann aber den selektiven Entzug aus einer intakten Membran wahrscheinlich nicht erklären.) Untersuchungen zum Lipidtransport von ABCA1 in Fibroblasten und Erythrozyten deuten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen cholesterol- und kalziumabhängigem Phospholipidtransport über die Zellmembran hin. Erst kürzlich wurde auch in Seeigelspermien ein ABCA1-Transporter nachgewiesen [Mengerink and Vacquier, 2002]. Die Exposition von PS auf der Zelloberfläche von Thrombozyten ist mit der Bildung von kleinen Membranvesikeln verbunden [Sims and Wiedmer, 2001]. Solche kleinen, gleichförmigen Plasmamembranvesikel wurden elektronenmikroskopisch auch an

einigen kapazitierten Eberspermien beobachtet.

→ *Schlussfolgerung*

Wenn es kapazitationsbedingt in einem Teil der Eberspermien zur transversalen Umverteilung der Phospholipide in der Plasmamembran kommt, erfolgt dies langsam und wahrscheinlich in vorzeitig akrosomreagierten Spermien und/oder absterbenden bzw. toten Zellen. Für ein kalziumabhängiges Scrambling gibt es keinen Hinweis, auch ein direkter Zusammenhang zwischen einer transversalen Umverteilung der Phospholipide und einem Anstieg der M540-Markierung ist fraglich. Die Diskrepanz zu veröffentlichten Arbeiten, die eine schnelle, von Kalzium unabhängige Aufhebung der transversalen Phospholipidasymmetrie in Eberspermien postulieren, bleibt ungeklärt, könnte eventuell auf einem methodischen Problem der PI-Färbung kapazitierter Eberspermien beruhen.

Bindung motiler kapazitierter Eberspermien an isolierte Zona pellucida

Zahlreiche Arbeiten zeigten bereits, dass es verbunden mit der Kapazitation von Säugerspermien zu einer Destabilisierung (Fluidisierung) der Zellmembran kommt. Dieser Effekt wird allgemein der Ablösung von Oberflächenproteinen, dem Entzug von Cholesterol sowie der lateralen und transversalen Umverteilung einzelner Membranbestandteile zugeschrieben [Töpfer-Petersen et al., 1996; Yanagimachi, 1994]. In dieser Arbeit wurde einer sicheren Unterscheidung zwischen lebenden und toten bzw. intakten und defekten Zellen große Aufmerksamkeit geschenkt. Die Lebend-Tot-Färbung mit PI wurde für kapazitierte Eberspermien so optimiert, dass eine stabile Differenzierung nicht-fixierter Zellen möglich war. Eine Kombination der PI-Färbung mit einer Mitochondrienfärbung (R123) machte zudem deutlich, dass unter diesen Bedingungen lediglich solche Spermien als tot (PI-positiv) analysiert wurden, deren Mitochondrien-Membranpotential gestört war. Da Spermien zum Durchdringen der Eizellhüllen eine aktive, hyperaktivierte Schwanzbewegung ausführen müssen, kann man davon ausgehen, dass nur Spermien mit intaktem Mitochondrien-Membranpotential (PI-negative) für die Befruchtung einer Eizelle in Frage kommen. Selbst wenn unter den gewählten Bedingungen ein Teil der kapazitierten Eberspermien nicht tot, sondern „nur“ extrem fragil (und somit PI-durchlässig) ist, können diese als für die Befruchtung einer Eizelle entscheidenden Spermien ausgeschlossen werden. Mikroskopische Untersuchungen der in-vitro kapazitierten Eberspermien bestätigten, dass lediglich PI-ungefärbte Zellen eine aktive Vorwärtsbewegung ausführten. Nie wurde ein motiles

Spermium mit AnV-Bindung beobachtet.

Um die Bindung in-vitro kapazitierter Eberspermien an Zona pellucida vom Schwein zu untersuchen, wurden die Spermien zunächst mit isolierten Zonae koinkubiert. Hierbei wurden sowohl unmarkierte als auch AnV- oder PNA-bindende Zellen assoziiert gefunden. Da häufig PNA-bindende Spermien beobachtet wurden, könnte die Akrosomreaktion an den Eizellhüllen während der gemeinsamen Inkubation ausgelöst worden sein. Mussten die zuvor kapazitierten und markierten Spermien hingegen aktiv die Zonae anschwimmen, konnten nur sehr wenige motile, grundsätzlich unmarkierte Spermien an der Eizellhülle binden. Mit diesen Versuchen konnte zumindest ausgeschlossen werden, dass eine Exposition von PS Voraussetzung für die Bindung kapazitierter Eberspermien an isolierte Zonae pellucidae ist.

In der Literatur wird die Spermienbindung an die Zona pellucida kontrovers diskutiert. Allgemein geht man nach wie vor von einer artspezifischen Erkennung und Rezeptor-vermittelten primären Bindung kapazitierter, lebender Säugerspermien aus [Benoff, 1997; Yanagimachi, 1994]. Bei Eberspermien wird die Bindung an ZP3 (ein Glykoprotein der Zona pellucida) dafür verantwortlich gemacht [Töpfer-Petersen, 1989].

In-vitro binden akrosomintakte Eberspermien an homologe Zonae pellucidae [Fazeli et al., 1997]. Dementsprechend konnte an in-vitro kapazitierten PI- und PNA-unmarkierten Eberspermien eine zunehmende Bindung isolierter Zonaproteine beobachtet werden [Harkema et al., 1998]. Andere Arbeiten beschrieben allerdings eine Bindung von Spermien verschiedener Subpopulationen an die Zona pellucida [Harrison, 1997]. Ein schnelles Auslösen der Akrosomreaktion an der Zona pellucida könnte die Bindung akrosomreagerter Spermien erklären [Benoff, 1997]. Wahrscheinlich ist die koordinierte Wirkung mehrerer Spermien in Nachbarschaft des die Zona pellucida durchdringenden und letztendlich befruchtenden Spermiums nötig. Insofern erscheint die Heterogenität der Spermien suspension von wesentlicher physiologischer Bedeutung. Über einen möglichst langen Zeitraum sollten sowohl vorzeitig akrosomreagierte Spermien als auch vollständig kapazitierte, hyperaktivierte Spermien, deren Akrosomreaktion nach Bindung an die Zona pellucida ausgelöst werden kann, vorhanden sein. Diese Heterogenität findet man auch in allen Proben. Welcher Spermien subpopulation jedoch letztendlich das in-vivo die Eizelle befruchtende Spermium entstammt, bleibt offen. Die meisten Autoren gehen davon aus, dass in-vivo wahrscheinlich eine langsame Kapazitation nötig ist, um ein möglichst langes Überleben der Spermien und eine koordinierte Befruchtung zu sichern [Harrison, 1997; Hunter, 1987; Pollard et al., 1991]. Im Gegensatz zu einer spezifischen Bindung über eine Rezeptor-Liganden-Erkennung wurde

allerdings auch ein unspezifisches Festhalten hyperaktivierter Spermien in den Poren der Zona pellucida diskutiert [Hunter, 2003]. Auch hierfür wäre allerdings eine stabile Integrität der Plasmamembran unerlässlich.

Nach Induktion der Akrosomreaktion mit einem Kalziumionophor konnte keine Exposition von endogenem PS am Spermienkopf beobachtet werden!

Eine Inkubation zuvor kapazitierter Eberspermien mit einem Kalziumionophor führte in ca. 58% der Zellen zu einem vollständigen Verlust der Kopfkappe. An der verbleibenden Reststruktur befand sich wahrscheinlich apikal die innere Akrosommembran, postakrosomal die Plasmamembran exponiert. Für Humanspermien wurde die vollständige Zugänglichkeit der inneren Akrosommembran (Antikörperbindung an CD46) nach Induktion der Akrosomreaktion mit einem Kalziumionophor gezeigt. Im Vergleich dazu führte eine spontane Akrosomreaktion oder die Induktion der Akrosomreaktion mit Progesteron zwar zur Zugänglichkeit des akrosomalen Inhaltes (PSA), ermöglichte jedoch nicht die Bindung des Antikörpers an die innere Akrosommembran [Jaiswal et al., 1999]. An akrosomreagierten Eberspermien wurde weder eine AnV-Bindung noch eine PNA-Markierung beobachtet. Eine methodische Ursache, die eine Markierung behindern würde, lag nicht vor, da einerseits einige der abgelösten vesikulären Membranstrukturen eine intensive AnV-Bindung auswiesen, andererseits eine deutliche AnV-Markierung der akrosomreagierten Spermien nach anschließender Kavitation oder Abkühlung auf Eis auftrat. Die akrosomale Seite der inneren Akrosommembran enthält somit entweder kein PS, oder vorhandenes PS bzw. die AnV-Bindung an PS wurde blockiert. Solch eine Behinderung der AnV-Bindung könnte z.B. durch eine kalziumvermittelte Wechselwirkung des PS mit Elementen des akrosomalen Inhaltes oder des Zytoskeletts entstehen.

Im Gegensatz zu den eigenen Versuchen an Eberspermien führte die Induktion der Akrosomreaktion an Mäusespermien zum Anstieg der AnV-Bindung. Ein Auslösen der Akrosomreaktion mit Progesteron führte zur AnV-Bindung an 62% der lebenden (PI-) Spermien im akrosomalen Bereich. Nach Induktion der Akrosomreaktion mit einem Kalziumionophor beschrieben die Autoren eine intensive AnV-Markierung des akrosomalen und postakrosomalen Bereiches in 59% der PI-ungefärbten Mäusespermien [Ávalos-Rodríguez et al., 2004]. Im Unterschied zu ejakulierten Spermien hatten epididymale Spermien nie Kontakt mit Faktoren des Seminalplasmas, denen unter anderem bei der

Stabilisierung der Spermienzellen, aber auch bei der Signaltransduktion während der Kapazitation und Befruchtung eine wesentliche Bedeutung zukommt. Eventuell könnte darin die Ursache der widersprüchlichen Ergebnisse begründet liegen. Spezies-spezifische Unterschiede und ein anderer Fusionsverlauf können ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Im postakrosomalen Bereich der Eberspermien weist die Plasmamembran eine hohe Stabilität auf. Eine Wechselwirkung des zytoplasmatisch akkumulierten PS mit Elementen des Zytoskeletts erscheint vor allem in diesem Bereich wahrscheinlich.

Der postakrosomale Bereich bzw. die Becherhülle der Säugerspermien stellt eine vergleichsweise sehr stabile morphologische Struktur dar, die in frischen Spermien selbst nach mäßiger Kavitation (10 min, 45 bar) überwiegend intakt erhalten bleibt. Eine AnV-Bindung im Bereich der Becherhülle wurde grundsätzlich nur an wenigen toten Spermien bzw. nach Kavitation der Zellen beobachtet. Lediglich <5% der frischen, 12% der kapazitierten und 6% der akrosomreagierten Eberspermien zeigten eine AnV-Markierung des Postakrosoms. Nach anschließender Kavitation waren vergleichsweise an 21% der frischen, 63% der kapazitierten und 69% der akrosomreagierten Zellen die Becherhüllen markiert. Offensichtlich führte die Kapazitation der Eberspermien auch im Bereich der Becherhülle zu einer Destabilisierung der Plasmamembran, wobei erst eine Kavitation oder ein schnelles Abkühlen auf Eis eine AnV-Bindung an endogenes PS im Äquatoralsegment, an der Becherhülle und/oder am Spermienhals ermöglichte. Diese Ergebnisse legen eine zytoplasmatische Lokalisation des endogenen PS auch im Bereich des Postakrosoms nahe. Eventuell unterstützt die zytoplasmatische Lokalisation des PS gerade in diesem Bereich dessen Stabilität. Eine Wechselwirkung mit dem Zytoskelett erscheint sehr wahrscheinlich. So wurde bereits mehrfach von der speziellen Zytoskelett-Struktur des Postakrosoms berichtet. In epididymalen Bullenspermien wurde in diesem Bereich Aktin detektiert, das nach einer Inkubation mit TritonX-100 nicht extrahiert werden konnte [Yagi and Paranko, 1995]. Castellani-Ceresa et al. fanden F-Aktin in akrosomreagierten Eberspermien (i) im Äquatoralsegment zwischen der Plasmamembran und der äußeren Akrosommembran, (ii) im Postakrosom zwischen der Plasmamembran und der äußeren Oberfläche der fibrillären Zytoskelett-Scheide und (iii) am Verbindungsstück und Spermienhals [Castellani-Ceresa et al., 1992]. An Erythrozyten gibt es Hinweise für eine kalziumabhängige Wechselwirkung zwischen Aminophospholipiden mit Spektrin-Aktin-Komplexen [Manno et al., 2002]. Ob es

in Spermien zu solch einer Interaktion kommt, bleibt Aufgabe weiterer Untersuchungen. Es sei hier darauf hingewiesen, dass in einer Arbeit an aktivierten Thrombozyten eine Interaktion von AnV mit F-Aktin in Anwesenheit von Kalzium gezeigt wurde [Tzima et al., 1999]. Ob die beobachtete AnV-Markierung im Bereich des Postakrosoms defekter Eberspermien tatsächlich auf eine Bindung an endogenes PS zurückzuführen ist oder eventuell auf einer Exposition zytoskelettärer Strukturen beruht, kann derzeit nicht beantwortet werden.

Die hohe Stabilität der Plasmamembran im Bereich des Postakrosoms lebender Spermien spricht für deren Bedeutung bei der Eizellbindung und -fusion. In-vivo wird die Akrosomreaktion zuvor kapazitierter Spermien an der Zona pellucida ausgelöst. Das die Eizelle befruchtende Spermium muss hyperaktiviert die Zona durchdringen, um in den Perivitellinraum zu gelangen und schließlich mit der Eizellmembran fusionieren zu können. Das Äquatoralsegment bildet den Ausgangspunkt für die Fusion des Spermiums mit der Eizelle, die wahrscheinlich ein Protein-vermittelter Prozess ähnlich der Virusfusion ist [Arts et al., 1997; Bedford, 1969]. Das die Plasmamembran im Bereich des Postakrosoms akrosomreagierter, lebender Spermien besondere fusogene Eigenschaften aufweist, wurde für Spermien von Rind und Mensch gezeigt [Arts et al., 1994; Arts et al., 1993]. Wahrscheinlich ist jedoch auch im Bereich des Postakrosoms eine Exposition von PS, bedingt durch ein Scrambling der Phospholipide, keine Voraussetzung für die stattfindenden Fusionsprozesse.

Es kommt kapazitationsbedingt zu einer engen Wechselwirkung zwischen Plasmamembran und äußerer Akrosommembran. Wahrscheinlich ist eine Ausbildung lateraler Membrandomänen in Plasmamembran und äußeren Akrosommembran, in denen PS zytoplasmatisch akkumuliert wird, Voraussetzung für diese enge Assoziation, die letztendlich an vielen Orten zur punktuellen Fusion beider Membranen miteinander führen kann.

PNA-Bindung an kapazitierte und akrosomreagierte Spermien ohne AnV-Markierung

In einem beträchtlichen Teil der kapazitierten (22%) und der akrosomreagierten (27%) Eberspermien wurde eine alleinige PNA-Bindung am akrosomalen Bereich beobachtet. Endogenes PS war für eine AnV-Markierung hingegen nicht zugänglich. Demnach müsste entweder (i) die apikale Plasmamembran dieser Zellen komplett abgelöst und das PS der äußeren Akrosommembran akrosomal angereichert sein, oder (ii) die Bindung von AnV an endogenes PS in der Plasmamembran und äußeren Akrosommembran müsste blockiert oder

(iii) durch die enge Nachbarschaft von PS- und PNA-Rezeptoren sterisch behindert sein. Letzteres konnte experimentell nicht bestätigt werden, da die Ergebnisse unabhängig von der Reihenfolge der Markierung und prozentual vergleichbar in Einzelfärbungen reproduziert werden konnten. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen kapazitierter Spermien zeigten bei einigen Zellen eine sehr dichte Assoziation von Plasmamembran und äußerer Akrosommembran. Dabei erschien die Plasmamembran einerseits wellenförmig der äußeren Akrosommembran überlagert mit punktuellen Kontaktstellen, andererseits wechselten sich kleine Bereiche aufgelöster Plasmamembran mit Membranbereichen, die fest mit der äußeren Akrosommembran assoziiert waren, ab. Die Kontaktstellen zwischen Plasmamembran und äußerer Akrosommembran könnten Startpunkte für eine Fusion der beiden Membranen miteinander darstellen. Der Kontakt könnte z.B. von Fusionsproteinen vermittelt werden. An der Fusion intrazellulärer Membranen sind in tierischen Zellen verschiedene fusionsvermittelnde Proteine beteiligt. Eine Gruppe recht kleiner, meist membranverankerter Proteine mit charakteristischer Aminosäurezusammensetzung bilden sogenannte SNARE-Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor). Sie akkumulieren reversibel zu helikalen Bündeln und sollen damit verbunden die fusionierenden Membranen dicht aneinander ziehen und somit schließlich deren Fusion auslösen [Jahn and Südhof, 1999]. SNARE-Proteine wurden auch im akrosomalen Bereich von Säugerspermien nachgewiesen und könnten dort die Exozytose des Akrosoms vermitteln [Ramalho-Santos et al., 2000]. Andererseits kommt es während der Kapazitation von Eberspermien zur Polymerisation von Aktin. Filamentöses Aktin kann wahrscheinlich eine dichte Zusammenlagerung von Plasmamembran und äußerer Akrosommembran und eventuell auch erste Membranvesikulationen vermitteln [Breitbart, 2002; Saxena et al., 1986b]. Nimmt man eine zytoplasmatische Lokalisation des endogenen PS in Plasmamembran und äußerer Akrosommembran, wie für die Mehrheit der frischen und kapazitierten Eberspermien in dieser Arbeit gezeigt, auch für die nur PNA-bindenden Zellen an, könnte PS an der Ausbildung und Erhaltung der Kontaktstellen zwischen Plasmamembran und äußerer Akrosommembran direkt beteiligt sein. PS gehört zu den fusogenen Lipiden, deren Struktur die Ausbildung fluider und fusogener Membranbereiche fördert. Seine negative Ladung ermöglicht eine kalziumvermittelte Annäherung von Lipidbilayern [Herrmann et al., 1991]. Von einer kalziumabhängigen Wechselwirkung zwischen Aminophospholipiden mit Spektrin-Aktin-Komplexen wurde in Erythrozyten berichtet [Manno et al., 2002]. Interessant erscheinen in diesem Blickwinkel auch endogene Annexine, eine Gruppe von Proteinen, die

Phospholipide in Anwesenheit von Kalzium binden. Bedingt durch deren bivalente Aktivität können sie kalziumabhängig Membranen miteinander verbinden, aber auch Wechselwirkungen zwischen Zytoskelett und Membran vermitteln [Creutz, 1992]. Hernandez et al. wiesen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie ein Annexin-artiges Protein (sp50) auf der zytoplasmatischen Seite von Plasmamembran und äußerer Akrosommembran in Meerschweinspermien nach [Hernandez et al., 1996]. Auch in Spermien von Bullen, Menschen, Hamstern und Ratten wurden endogene Annexine nachgewiesen [Feinberg et al., 1991].

Die Assoziation von Plasmamembran und äußerer Akrosommembran in kapazitierten Eberspermien ist offensichtlich sehr stabil, da selbst nach Kavitation der zuvor kapazitierten Zellen ein Teil der Spermien (ca. 11%) nach wie vor nur mit PNA markiert werden konnte. Eberspermien mit ausschließlicher PNA-Markierung könnten ein Zwischenstadium auf dem Weg zur klassischen, exozytotischen Akrosomreaktion darstellen. Verschiedene Exozytose-Prozesse benötigen tatsächlich eine selektive Anreicherung anionischer Phospholipide auf den zytoplasmatischen Seiten der interagierenden Membranen [Devaux and Zachowski, 1994]. Auch für die an den Exozytoseprozessen beteiligten Proteine Synexin (chromaffine Zellen) und verschiedene SNARE-Proteine (neurosekretorische Zellen) wurde gezeigt, dass für ihre kalziumabhängige Wechselwirkung mit Membranen eine zytoplasmatische Lokalisation anionischer Lipide nötig war [Pollard et al., 1988; Quetglas et al., 2002].

Vesikulation von Plasmamembran und äußerer Akrosommembran

Sowohl in den Proben kapazitierter Eberspermien als auch in denen nach Induktion der Akrosomreaktion konnten von den Spermien abgelöste vesikuläre Membranstrukturen beobachtet werden. Diese waren entweder unmarkiert, zeigten eine AnV-Bindung, eine PNA-Markierung oder eine Komarkierung mit AnV und PNA. Scheinbar sind verschiedene Mechanismen für die Entstehung solch diverser Vesikel verantwortlich. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von kapazitierten Eberspermien zeigten dementsprechend auch unterschiedliche morphologische Membranstrukturen. Sowohl in den eigenen Versuchen als auch in älteren Arbeiten an Human- und Eberspermien wurde gezeigt, dass Vesikulationen der Plasmamembran, der beiden Akrosommembranen, aber auch zwischen Plasmamembran und äußerer Akrosommembran stattfinden können [Nagae et al., 1986; Szöllösi and Hunter, 1978]. Die Abbildung 34 zeigt schematisch die aus den Ergebnissen abgeleiteten möglichen Membraninteraktionen während der Spermienogenese.

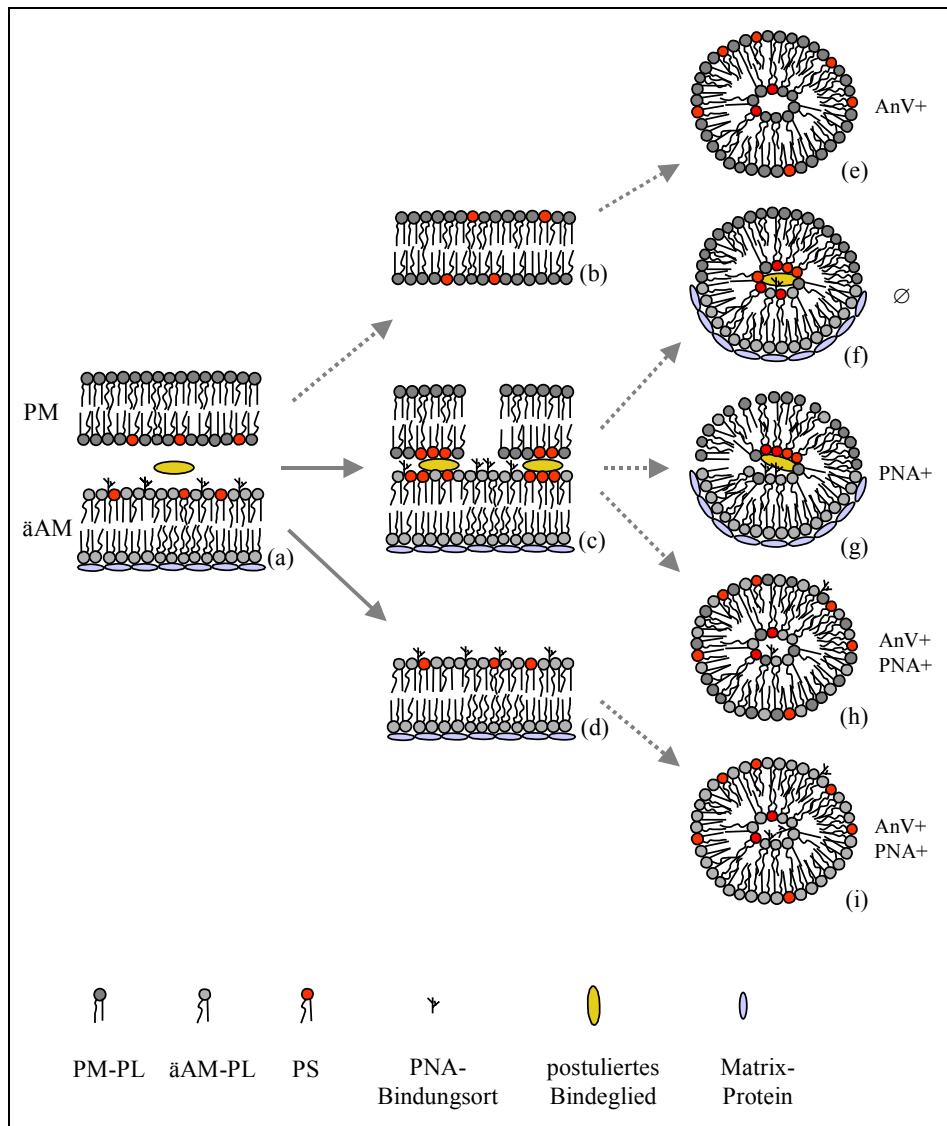


Abb. 34: Schematische Zusammenfassung möglicher Membraninteraktionen während der Genese von Eberspermien: (a) In frisch gewaschenen, lebenden Eberspermien ist PS auf der zytosomatischen Seite von Plasmamembran (PM) und äußerer Akrosommembran (äAM) akkumuliert, während spezifische Lektinbindungsstellen lediglich auf der zytosomatischen Seite der äAM lokalisiert sind. (b, e) Während der Inkubation der Spermien kommt es zunehmend zum Absterben der Zellen, die Integrität der PM wird gestört. Teilweise kommt es zur Ablösung der PM, die sich eventuell später zu vesikulären Strukturen zusammenlagert. (c) Kapazitationsbedingt kommt es örtlich zu einer dichten Zusammenlagerung von PM und äAM. Dies erfolgt wahrscheinlich kalziumvermittelt über ein Bindeglied. Bei diesem postulierten Bindeglied könnte es sich um endogene Annexine, SNARE-Proteine, Zytoskelett-Elemente u.a. handeln. In den elektronenmikroskopischen Bildern kapazitierter Spermien erscheinen teilweise Löcher in der PM. Solche Fehlstellen können präparationsbedingt entstehen, stellen aber mit Sicherheit laterale PM-Domänen dar, die besonders fragil sind. (d, i) Ein Ablösen der PM führt zur Exposition der äAM, auf deren zytosomatischer Seite einerseits PS akkumuliert ist, andererseits PNA an spezifische Zuckerstrukturen bindet. Teilweise kommt es auch zur Vesikulation der äAM. (f-g) Mischvesikel, deren Bildung nach Fusion von PM und äAM entstehen könnten.

Während die Zusammenlagerung von Plasmamembran und äußerer Akrosommembran, die Ablösung von Teilen der Plasmamembran und die Exposition der äußeren Akrosommembran durch die elektronenmikroskopischen Arbeiten bestätigt wurden, kann über die Entstehung und Zusammensetzung der Vesikel nur spekuliert werden. Die Entstehung von Mischvesikeln nach Induktion der Akrosomreaktion mit Kalziumionophor wurde mehrfach beobachtet, ob es allerdings zu einer symmetrischen Verteilung der Lipide in den Vesikeln kommt, oder ob laterale und transversale Unterschiede zumindest über einen gewissen Zeitraum erhalten bleiben, ist unklar [Gillis et al., 1978].

Der akrosomalen Seite der äußeren Akrosommembran sind Matrixproteine aufgelagert, die auch an den Vesikeln fest assoziiert blieben [Watson et al., 1992]. Eventuell sind diese Matrixproteine für den strukturellen Erhalt der Membran verantwortlich. Ebenso könnten die mutmaßlichen Bindeglieder zwischen den zytoplasmatischen Seiten von Plasmamembran und äußerer Akrosommembran strukturerhaltend wirken. Ein stabil am zytoplasmatischen PS assoziierter Faktor könnte zumindest erklären, warum auch nach Vesikulation z.T. keine AnV-Bindung beobachtet wurde. Solch ein Bindeglied könnte, wie bereits diskutiert, zytoplasmatisches Kalzium in Verbindung mit Zytoskelettelementen, endogenen Annexinen, SNARE-Proteinen u.a. sein. In Untersuchungen an Knorpelzellen (Chondrozyten) wurde z.B. AnV als ein Hauptbestandteil von Matrixvesikeln identifiziert, das hier eine wichtige Rolle in der Regulierung des Kalziumeinstromes in diese Vesikel hat. Die Matrixvesikel unterscheiden sich in ihrer Lipidzusammensetzung deutlich von der Plasmamembran der Chondrozyten und enthalten deutlich mehr PS. In den PS-reichen Liposomen bilden sich AnV-Hexamere, die wahrscheinlich für den beobachteten Anstieg des Kalziumeinstromes verantwortlich waren [Kirsch et al., 1997]. Über die Identität und den Verbleib der PNA-Bindungsstellen nach Akrosomreaktion gibt es bisher keine Untersuchungen. PNA ist spezifisch für β -D-Galaktose-Reste und bindet selektiv an die äußere Akrosommembran. Unklar ist jedoch, ob ein Glykolipid oder ein Glykoprotein für diese spezifische Bindung verantwortlich ist und ob es während der Genese zu einer transversalen Umverteilung kommt.

Um in zukünftigen Arbeiten genauere Aussagen zu den stattfindenden Fusions- und Vesikulationsschritten treffen zu können, ist die Nutzung von bisher nur unzureichend bekannten Membran- und Bilayer-spezifischen Proteinmarkern unumgänglich.

Vorhandensein lateraler Membrandomänen in Säugerspermien

In der Einleitung wurde bereits erläutert (1.3.2.3, S.23), wie kontrovers das Vorkommen lateraler Membrandomänen in der Plasmamembran von Säugerspermien diskutiert wird. Während zahlreiche Befunde für eine differenzierte Organisation entsprechend der morphologischen Spermienstrukturen (Kopf: akrosomal, postakrosomal; Hals; Mittelstück; Schwanz) sprechen, gibt es über das Vorhandensein koexistierender Lipidphasen widersprüchliche Ergebnisse.

Einige Daten der Untersuchungen an Eberspermien könnten durch laterale Lipiddomänen in der Plasmamembran erklärt werden. So blieb unklar, warum es bei der Markierung der Plasmamembran mit NBD-PL über den gesamten Messzeitraum (Durchflusszytometrie) zu einem stetigen Fluoreszenzanstieg in lebenden Zellen kam, obwohl die eingesetzte Labelmenge ($< 2\text{mol}\%$) ein Quenching nach Einbau in die Plasmamembran ($t_{1/2} < 10\text{ s}$) eigentlich ausschließen sollte. Da die Translokation des NBD-PS sehr schnell auf die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran erfolgte ($t_{1/2} \sim 4,5\text{ min}$), ist es auch unwahrscheinlich, dass zytoplasmatisch angereicherte Label den zunehmenden Fluoreszenzanstieg über Stunden erklären. Eine Umverteilung der Label zwischen Zellen einer Suspension, ein Transport zu intrazellulären Membranen oder eine laterale Umverteilung zwischen Membrandomänen der Plasmamembran könnte den beobachteten Fluoreszenzanstieg ebenfalls erklären. Für eine Umverteilung des zunächst in defekte Spermien eingebauten Labels in die Plasmamembran der lebenden Zellen spräche zumindest die Angleichung der Fluoreszenzintensitäten lebender und toter, mit NBD-PS markierter Eberspermien. Es wäre allerdings auch möglich, dass sich die NBD-PL in lebenden Zellen zunächst inhomogen in bestimmten Membrandomänen der Plasmamembran einbauen und von dort erst lateral und transversal umverteilt werden.

Des weiteren deuten die Versuche zur AnV-Bindung an kapazitierten und akrosomreagierten Eberspermien auf das Vorhandensein lateraler Lipiddomänen hin. Die Bindung des PNA erfolgte offensichtlich an Membrandomänen, in denen PS für eine AnV-Bindung nicht zugänglich war. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen kapazitierter Eberspermien unterstützen die Theorie lateraler Membrandomänen. Einerseits wurden stabile, fest mit der äußeren Akrosommembran assoziierte Bereiche der Plasmamembran beobachtet, die sich mit Bereichen aufgelöster Plasmamembran abwechselten, andererseits wurde eine Markierung mit Biotin-AnV, detektiert durch die Bindung eines goldmarkierten Biotin-Antikörpers, an kapazitierten Spermien nur sehr selten und dann vereinzelt an Kontaktstellen sich

abschnürender Membranstücke gefunden. Verschiedene ältere elektronenmikroskopische Arbeiten an Säugerspermien zeigten, dass während der Kapazitation protein- und cholesterolfreie Gebiete in Plasmamembran und äußerer Akrosommembran entstehen [Bawa et al., 1993; Bearer and Friend, 1982; Tesarik and Fléchon, 1986].

Flesch et al. postulierten in einem Modell für Eberspermien, dass die Umverteilung und der Entzug von Cholesterol aus kapazitierten Spermien durch die Ausbildung eines apikalen Membranrafts erklärt werden könnte [Flesch et al., 2001]. Die hohe Cholesterolkonzentration im akrosomalen Bereich der Spermien, charakterisiert über die starke Flipin-Markierung dieser Struktur, das Vorkommen von Caveolin-1 im Spermienkopf (nicht publizierte Daten von B.M. Gadella, zitiert in [Flesch et al., 2001]) sowie die Umverteilung eines GPI-verankerten Plasmamembranproteins (PH-20) auf die Oberfläche des apikalen Kopfes von Rattenspermien [Seaton et al., 2000] könnten demnach auf die Ausbildung apikaler Rafts hindeuten.

Travis et al. wiesen für Spermien von Maus und Meerschwein eine Anreicherung von Caveolin-1 in der Triton-unlöslichen Membranfraktion nach. Untersuchungen mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie zeigten zudem, dass Caveolin-1 bei diesen Spezies im Bereich des Akrosoms und des Spermischwanzes vorkommen. Syntaxin-2, ein Protein, das an der Exozytose des Akrosoms beteiligt ist, befand sich sowohl in der Raftfraktion als auch in der Nichtraftfraktion [Travis et al., 2001]. Weitere Arbeiten an Mäusespermien deuten auf ein Vorhandensein mehrerer molekular unterschiedlich zusammengesetzter Raftstrukturen hin [Trevino et al., 2001]. So berichten die Autoren einerseits von einer Kollokalisation von Caveolin-1 mit bestimmten Kalziumkanälen (*Trp1*), die eine wichtige Rolle bei der kalziumgesteuerten Signaltransduktion während der Kapazitation und Akrosomreaktion spielen könnten. Andererseits wurde eine spezifische Raftkomponente – das Gangliosid GM1 – unabhängig von Caveolin-1 identifiziert. Ein Nachweis, dass tatsächlich nur Membrandomänen der Plasmamembran isoliert wurden, erfolgte in keiner der Arbeiten. Auch die Lipidzusammensetzung der isolierten Raftfraktion wurde nicht untersucht. Erste eigene Versuche zur Präparation von Triton-unlöslichen Lipiddomänen aus der Plasmamembran erfolgten an Forellenspermien. Da diese kein Akrosom besitzen, bieten sie sich zur Etablierung der Technik besonders an.

Die Plasmamembran von Forellenspermien enthält Lipiddomänen mit erhöhtem CHO/PL-Verhältnis. Dies weist auf die physiologische Bedeutung einer lateral asymmetrischen Verteilung der Membranlipide in Spermienzellen hin.

Sogenannten Raftstrukturen in der Plasmamembran tierischer Zellen wurde in den letzten Jahren wiederholt eine entscheidende Rolle bei der Regulation verschiedener Zellfunktionen zugeschrieben. Die ursprüngliche Beschreibung solcher Lipiddomänen bezog sich auf deren Unlöslichkeit in nichtionischem Detergens [Simons and Ikonen, 1997]. Diesem Ansatz folgend sollten die eigenen Untersuchungen klären, ob auch in Forellenspermien Detergens-unlösliche Lipiddomänen separierbar sind. Detergens-unlösliche Membranfraktionen wurden bereits in Seeigel-, Maus- und Meerschweinspermien beschrieben [Ohta et al., 1999; Ohta et al., 2000; Travis et al., 2001; Trevino et al., 2001]. Eine nach Tritonlyse und Gradientenzentrifugation isolierte Membranfraktion aus Seeigelspermien wies zwar eine Anreicherung von Glykosphingolipiden, PS und Diacylglycerol, nicht hingegen von Cholesterol, Sphingomyelin und Caveolin-1 auf [Ohta et al., 1999; Ohta et al., 2000]. Im Gegensatz dazu wurde in Säugerspermien (Maus und Meerschwein) eine Anreicherung von Caveolin-1 in der Triton-unlöslichen Membranfraktion nachgewiesen, die Lipidzusammensetzung der Membranfraktion wurde jedoch nicht untersucht [Travis et al., 2001].

In der vorliegenden Arbeit konnten aus Forellenspermien erfolgreich Rafts präpariert werden. In Abhängigkeit von der eingesetzten Spermien- und Tritonkonzentration bei 4°C konnten 12-90% der Gesamtspermienlipide nach zusätzlicher mechanischer Einwirkung (Pottern) solubilisiert werden. Ein wiederholtes Resuspendieren der zunächst nicht gelösten Membranstrukturen in Triton-haltigem Puffer hatte eine weitere Solubilisierung zur Folge. Ob dies letztendlich zur vollständigen Lyse aller Membranen geführt hätte, wurde nicht getestet, deutete sich in den Versuchen jedoch an. Eine effektive Lyse konnte mit 1%igem Triton in einer Spermiesuspension von 10^9 Zellen/ml in Anwesenheit von extrazellulärem Kalzium (1,8 mM) erreicht werden. Unter diesen Bedingungen waren ca. 90% der Gesamtspermienlipide solubilisiert. Um eindeutig nur Lipide der Plasmamembran untersuchen zu können, wäre (erst recht bei Säugerspermien) eine vorherige Plasmamembranisolation nötig. Da Forellenspermien kein Akrosom und nur ein ringförmiges Mitochondrium besitzen, wurde jedoch zunächst auf eine Plasmamembranisolation verzichtet. Eine Auftrennung der zuvor solubilisierten Zellbestandteile über einen Dichtegradienten gelang prinzipiell in allen Versuchen, am effektivsten jedoch über einen „kontinuierlichen“

Gradienten nach 18 Stunden Ultrazentrifugation. Allerdings war auch in diesen Varianten noch kein Zentrifugationsgleichgewicht erreicht, da die Wiederfindungsrate in den Banden unter 50% lag und das unterschichtete Zellmaterial wahrscheinlich über den gesamten Gradienten verteilt war. Außerdem befand sich die oberste Bande im Bereich 15-20%iger Saccharose, während andere Autoren von einer „Raftbande“ im Bereich 5-7%iger Saccharose nach 18 h Zentrifugation mit 200.000×g berichten [Yamamura et al., 1997].

Die leichteste Membranbande (am weitesten im Gradienten aufgestiegen) war in allen Versuchen durch ein erhöhtes CHO/PL-Verhältnis gekennzeichnet, was auf Lipidebene als typisches Kennzeichen von Raftstrukturen angesehen wird.

Die Untersuchungen an Forellenspermien zeigten vor allem, dass eine feine Abstimmung des Protokolls mit Kontrollen aller Präparationsschritte für weitere Versuche unbedingt nötig ist. Die Abhängigkeit der Tritonlyse von der eingesetzten Spermienkonzentration, der Tritonkonzentration und der Ionenzusammensetzung muss für vergleichende Untersuchungen ebenso beachtet werden, wie die sich anschließenden Zentrifugationsbedingungen, die in den Veröffentlichungen zur Isolierung von Membranrafts stark variieren. Um Aussagen zur physiologischen Relevanz von Lipiddomänen in der Plasmamembran von Spermien treffen zu können, sind funktionelle Untersuchungen während der Genese der Spermien auch unter Berücksichtigung spezifischer Raftproteine nötig. Erste Proteincharakterisierungen der isolierten Raftbanden erfolgten für Forellenspermien in Kooperation mit der französischen Arbeitsgruppe [Labbé et al., 2004]. Eine Gefrierkonservierung der Spermien ermöglichte zwar weiterhin die Isolierung einer cholesterolreichen Membranfraktion, deren Proteinmuster unterschied sich allerdings von dem der Raftbande frischer Forellenspermien. Eventuell bieten diese Versuche einen neuen Ansatz zum Verständnis der molekularen Ursachen für die gestörte Fruchtbarkeit gefrierkonservierter Spermien. Ein Cholesterolentzug aus der Plasmamembran der Forellenspermien mittels β -Cyclodextrin bewirkte analog zu anderen tierischen Zellen eine Zerstörung der cholesterolreichen Membrandomänen [Labbé et al., 2004].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen die Bedeutung der transversalen Asymmetrie der Phospholipide für die Funktionsfähigkeit der Spermien während der Genese. Diese transversale Asymmetrie geht mit einer lateralen Inhomogenität der Spermienmembranen einher und wird in Vorbereitung auf die Befruchtung der Eizelle sensibel reguliert.

Literaturverzeichnis

- Alouf, J.E. and Freer, J.H. (1992). *Sourcebook of bacterial protein toxins*. London, Academic Press.
- Althouse, G.C., Bruns, K.A., Evans, L.E., Hopkins, S.M. and Hsu, W.H. (1995). A simple technique for the purification of plasma membranes from ejaculated boar spermatozoa. *Preparative Biochemistry* **25**: 69-80.
- Anand, A.S., Hoekstra, W.G. and First, N.L. (1967). Effect of aging of boar spermatozoa on cellular loss of DNA. *Journal of Animal Science* **26**: 171-173.
- Andersen, R.G.W. (1998). The caveolae membrane system. *Annual Reviews in Biochemistry* **67**: 199-225.
- Arts, E.G.J.M., Jager, S. and Hoekstra, D. (1994). Evidence for the existence of lipid-diffusion barriers in the equatorial segment of human spermatozoa. *Biochemistry Journal* **304**: 211-218.
- Arts, E.G.J.M., Kuiken, J., Jager, S. and Hoekstra, D. (1993). Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa: Specific involvement of the equatorial segment after acrosome reaction. *European Journal of Biochemistry* **217**: 1001-1009.
- Arts, E.G.J.M., Wijchman, J.G., Jager, S. and Hoekstra, D. (1997). Protein involvement in the fusion between the equatorial segment of acrosome-reacted human spermatozoa and liposomes. *Biochemistry Journal* **325**: 191-198.
- Austin, C.R. (1951). Observation on the penetration of sperm into the mammalian egg. *Australian Journal of Science Research [B]* **4**: 581-596.
- Austin, C.R. (1952). The Capacitation of mammalian sperm. *Nature* **170**(4321): 326.
- Ávalos-Rodríguez, A., Ortiz-Muniz, A.R., Ortega-Camarillo, C., Vergara-Onofre, M., Rosales-Torres, A.M. and Rosado-García, A. (2004). Fluorometric study of rabbit sperm head membrane phospholipid asymmetry during capacitation and acrosome reaction using annexin-V FITC. *Archives of Andrology* **50**: 1-13.
- Baldini, P., Incerpi, S., Lambert-Gardini, S., Spinedi, A. and Luly, P. (1989). Membran lipid alterations and Na⁺-pumping activity in erythrocytes from IDDM and NIDDM subjects. *Diabetes* **38**(7): 825-831.
- Bawa, S.R., Pabst, M.A., Werner, G. and Bains, H.K. (1993). Capacitated and acrosome reacted spermatozoa of goat (*Capra-Indicus*) - A fluorescence and electron microscopic study. *Andrologia* **25**(3): 123-135.
- Bearer, E.L. and Friend, D.S. (1980). Anionic lipid domains: correlation with functional topography in a mammalian cell membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **77**(11): 6601-6605.

- Bearer, E.L. and Friend, D.S. (1982). Modifications of anionic-lipid domains preceding membrane fusion in guinea pig sperm. *The Journal of Cell Biology* **92**: 604-615.
- Bedford, J.M. (1969). Morphological aspects of sperm capacitation in mammals. *Schering Symposium Adv. Bioscience* **4**: 35-48.
- Benoff, S. (1997). Carbohydrates and fertilization: an overview. *Molecular Human Reproduction* **3**(7): 599-637.
- Benoff, S., Hurley, I., Cooper, G.W., Mandel, F.S., Rosenfeld, D.L. and Hershlag, A. (1993). Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss. *Human Reproduction* **8**: 2141-2154.
- Berruti, G. and Franchi, E. (1986). Calcium and polyphosphoinositides: their distribution in relation to the membrane changes occurring in the head of boar spermatozoa. *European Journal of Cell Biology* **41**: 238-245.
- Beyers, E.M., Comfurius, P., Dekkers, D.W.C. and Zwaal, R.F.A. (1999). Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1439**: 317-330.
- Billard, R. (1979). La gamétogenèse, le cycle sexuel et le contrôle de la reproduction chez les poissons téléostéens. *The Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture* **273**: 117-136.
- Billard, R. (1983). Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. *Cell and Tissue Research* **228**: 205-218.
- Bitbol, M., Fellmann, P., Zachowski, A. and Devaux, P.F. (1987). Ion regulation of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine outside-inside translocation in human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* **904**: 268-282.
- Bleil, J.D. and Wassarman, P.M. (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: Sequence of events and induction of the acrosome reaction by zona pellucida glycoprotein. *Development in Biology* **95**: 317-324.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemical Physiology* **37**: 911-917.
- Breitbart, H. (2002). Role and regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis. *Journal of Reproduction Immunology* **53**: 151-159.
- Bretscher, M.S. and Munro, S. (1993). Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* **261**(5126): 1280-1281.
- Brown, D.A. and London, E. (1998a). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **14**: 111-136.
- Brown, D.A. and London, E. (1998b). Structure and function of ordered lipid domains in biological membranes. *Journal of Membran Biology* **164**(2): 103-114.

- Buhr, M.M., Curtis, E.F. and Somnapan Kukuda, N. (1994). Composition and behavior of head membran lipids of fresh an cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* **31**(3): 224-238.
- Buton, X., Morrot, G., Fellmann, P. and Seigneuret, M. (1996). Ultrafast glycerophospholipid-selective transbilayer motion mediated by a protein in the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 6651-6657.
- Castellani-Ceresa, L., Brivio, M.F. and Radaelli, G. (1992). F-actin in acrosome-reacted boar spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* **33**: 99-107.
- Cho, C.W., Liu, Y., Yan, X., Henthorn, T. and Ng, K.Y. (2000). Carrier-mediated uptake of rhodamine 123: implications on its use for MDR research. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **279**(1): 124-130.
- Christen, R., Gatti, J.L. and Billard, R. (1987). Trout sperm motility: The transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement. *European Journal of Biochemistry* **166**: 667-671.
- Connor, J., Pak, C.C. and Schroit, A.J. (1994). Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells - relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 2399-2404.
- Connor, J., Pak, C.H., Zwaal, R.F.A. and Schroit, A.J. (1992). Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. *The Journal of Biological Chemistry* **267**: 19412-19417.
- Creutz, C.E. (1992). The annexins and exocytosis. *Science* **258**: 924-931.
- Cross, N.L. (1998). Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biology of Reproduction* **59**: 7-11.
- Dacheux, J.L., Dacheux, F. and Payuignon, M. (1989). Changes in sperm surface membrane and luminal protein fluid content during epididymal transit in the boar. *Biology of Reproduction* **40**(3): 635-651.
- Daleke, D.L. (2003). Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *Journal of Lipid Research* **44**(2): 233-242.
- Davis, B.K., Byrne, R. and Hungund, B. (1979). Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* **558**(3): 257-266.
- Devaux, P.F., Fellmann, P. and Hervé, P. (2002). Investigation on lipid asymmetry using lipid probes comparison between spin-labeled and fluorescent lipids. *Chemistry and Physics of Lipids* **116**: 115-134.
- Devaux, P.F. and Zachowski, A. (1994). Maintenance and consequences of membrane phospholipid asymmetry. *Chemistry and Physics of Lipids* **73**: 107-120.

- Dietrich, C., Bagatolli, L.A., Volovyk, Z.N., Thompson, N.L., Levi, M., Jacobson, K. and Gratton, E. (2001). Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophysical Journal* **80**: 1417-1428.
- Ehrenwald, E., Parks, J.E. and Foote, R.H. (1988). Cholesterol efflux from bovine sperm. I. induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. *Gamete Research* **20**: 145-157.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A. and Ezekewitz, R.A.B. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**(6782): 85-90.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. and Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserin on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of Immunology* **148**: 2207-2216.
- Fazeli, A., Duncan, A.E., Watson, P.F. and Holt, W.V. (1999). Sperm-oviduct interaction; induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biology of Reproduction* **60**(4): 879-886.
- Fazeli, A., Hage, W.J., Cheng, F.-P., Voorhout, W.F., Marks, A., Bevers, M.M. and Colenbrander, B. (1997). Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biology of Reproduction* **56**(2): 430-438.
- Feinberg, J.M., Rainteau, D.P., Kaetzel, M.A., Dacheux, J.-L., Dedman, J.R. and Weinman, S.J. (1991). Differential localization of annexins in ram germ cells: A biochemical and immunocytochemical study. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **39**(7): 955-963.
- Ferreira, F.M. (1998). Function aspects of porcine sperm binding to the zona pellucida using the hemizona assay. Promotion, Institut für Reproduktionsmedizin, Hannover, Tierärztliche Hochschule: 77.
- Flesch, F.M., Brouwers, J.F.H.M., Nievelstein, P.F.E.M., Verkleij, A.J., van Golde, L.M.G.V., Colenbrander, B. and Gadella, B.M. (2001). Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *The Journal of Cell Science* **114**: 3543-3555.
- Flesch, F.M., Colenbrander, B., van Golde, L.M. and Gadella, B.M. (1999). Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **262**(3): 787-792.
- Flesch, F.M. and Gadella, B.M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta* **1469**: 197-235.
- Forsman, C.A. and Pinto Da Silva, P. (1989). Surface views of spermatozoa as revealed by fracture-flip. *The Journal of Cell Science* **92**: 415-426.
- Fraser, L.R. (1995). Ionic control of sperm function. *Reproduction and Fertility Development* **7**: 905-925.

- Gadella, B.M., Flesch, F.M., van Golde, L.M.G.V. and Colenbrander, B. (1999a). Dynamics in the membrane organization of the mammalian sperm cell and functionality in fertilization. *Veterinary Quarterly* **21**(4): 142-146.
- Gadella, B.M., Gadella, T.W.J., Colenbrander, B., Van Golde, L.M.G. and Lopez-Cardozo, M. (1994). Visualization and quantification of glycolipid polarity dynamics in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *The Journal of Cell Science* **107**: 2151-2163.
- Gadella, B.M. and Harrison, R.A.P. (2000). The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* **127**: 2407-2420.
- Gadella, B.M. and Harrison, R.A.P. (2002). Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biology of Reproduction* **67**: 340-350.
- Gadella, B.M., Miller, N.G.A., Colenbrander, B., Van Golde, L.M.G. and Harrison, R.A.P. (1999b). Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. *Molecular Reproduction and Development* **53**: 108-125.
- Garbers, D.L. (1989). Molecular basis of fertilization. *Annual Reviews in Biochemistry* **58**: 719-742.
- Gillis, G., Peterson, R., Russell, L., Hook, L. and Freud, M. (1978). Isolation and characterization of membrane vesicles from human and boar spermatozoa: methods using nitrogen cavitation and ionophor induced vesiculation. *Preparative Biochemistry* **8**(5): 363-378.
- Ginsburg, A.S. (1963). Sperm-egg association and its relationship to the activation of the egg in salmonid fishes. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **11**: 13-33.
- Green, C.E. and Watson, P.F. (2001). Comparison of the capacitation-like state of boar spermatozoa with true capacitation. *Journal of Reproduction* **122**(6): 889-898.
- Grizard, G., Sion, B., Bauchart, D. and Boucher, D. (2000). Separation and quantification of cholesterol and major phospholipid classes in human semen by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *Journal of Chromatography* **740**: 101-107.
- Gross, M.K., Toscano, D.G. and Toscano, W.A.J. (1987). Calmodulin-mediated adenylate cyclase from mammalian sperm. *The Journal of Biological Chemistry* **262**: 8672-8676.
- Hamon, Y., Broccardo, C., Chambenoit, O., Luciani, M.F., Toti, F., Chaslin, S., Freyssinet, J.M., Devaux, P.F., Mcneish, J., Marguet, D. and Chimini, G. (2000). ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nature Cell Biology* **2**: 399-406.
- Harkema, W., Harrison, R.A.P., Miller, N.G.A., Tooper, E.K. and Woelders, H. (1998). Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of intact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. *Biology of Reproduction* **58**: 421-430.

- Harrison, R.A.P. (1997). Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. *Journal of Reproduction and Fertility* **52**: 195-211.
- Harrison, R.A.P. (2003). Cyclic AMP signalling during mammalian sperm capacitation - still largely terra incognita. *Reproduction in Domestic Animals* **38**: 102-110.
- Harrison, R.A.P., Ashworth, P.J.C. and Miller, N.G.A. (1996). Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Molecular Reproduction and Development* **45**: 378-391.
- Harrison, R.A.P., Mairé, B. and Miller, N.G.A. (1993). Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated Ca²⁺ influx in boar sperm populations. *Molecular Reproduction Development* **35**: 197-208.
- Harrison, R.A.P. and Miller, N.G.A. (2000). cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Molecular Reproduction and Development* **55**: 220-228.
- Heinrich, R., Brumen, M., Jaeger, A., Müller, P. and Herrmann, A. (1997). Modelling of phospholipid translocation in the erythrocyte membrane: a combined kinetic and thermodynamic approach. *Journal of Theoretical Biology* **185**: 295-312.
- Hernandez, E.O., Roa-Espitia, A.L., Trejo, J.C. and Mujica, A. (1996). Sperm protein (sp 50) binds to acrosome and plasma membranes in a Ca²⁺-dependent manner: possible role in acrosome reaction. *Molecular Reproduction and Development* **43**: 366-375.
- Herrmann, A., Zachowski, A., Devaux, P.F. and Blumenthal, R. (1991). Control of fusion of biological membranes by phospholipid asymmetry. In : *"Cell and model membrane interactions"*, Ohki, S., ed., New York and London, Plenum Press: 89-113.
- Holthuis, J.C.M., Van Meer, G. and Huitema, K. (2003). Lipid microdomains, lipid translocation and the organization of intracellular membrane transport (Review). *Molecular Membrane Biology* **20**: 231-241.
- Hooper, N.M. (1999). Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Molecular Membrane Biology* **16**: 145-156.
- Hoskins, D.D. and Casillas, E.R. (1975). Function of cyclic nucleotides in mammalian spermatozoa. In: *"Handbook of physiology, Section VII: Endocrinology, Vol. 5, Male Reproduction System"*, Hamilton, D. W. and Greep, R. O, eds., Washington, The American Physiological Society: 453.
- Huang, T.T.F.J. and Yanagimachi, R. (1985). Inner acrosomal membrane of mammalian spermatozoa: Its properties and possible functions in fertilization. *The American Journal of Anatomy* **174**: 249-268.
- Hunter, R.H.F. (1987). The timing of capacitation in mammalian spermatozoa - a reinterpretation. *Research in Reproduction* **19**(2): 3-4.

Hunter, R.H.F. (2003). Reflections upon sperm-endosalpingeal and sperm-zona pellucida interactions in vivo and in vitro. *Reproduction in Domestic Animals* **38**: 147-154.

Jahn, R. and Südhof, T.C. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annual Reviews in Biochemistry* **68**: 863-911.

Jaiswal, B.S., Eisenbach, M. and Tur-Kaspa, I. (1999). Detection of partial and complete asrosome reaction in human spermatozoa: which inducers and probes to use? *Molecular Human Reproduction* **5**(3): 214-219.

Kamp, D., Sieberg, T. and Haest, C.W. (2001). Inhibition and stimulation of phospholipid scrambling activity. Consequences for lipid asymmetry, echinocytosis, and microvesiculation of erythrocytes. *Biochemistry* **40**: 9438-9446.

Kan, F.W.K. and Lin, Y. (1996). Topographical distribution of phospholipids in boar sperm plasma and intracellular membranes as revealed by Freeze-Fracture Cytochemistry. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **44**(7): 687-701.

Kirsch, T., Nah, H.D., Demuth, D.R., Harrison, G., Golub, E.E., Adams, S.L. and Pacifici, M. (1997). Annexin V-mediated calcium flux across membranes is dependent on the lipid composition: Implications for cartilage mineralization. *Biochemistry* **36**(11): 3359-3367.

Kol, M.A., Van Laak, A.N.C., Rijkers, D.T., Killian, J.A., De Kroon, A.I. and De Kruijff, B. (2003). Phospholipid flop induced by transmembrane peptide in model membranes is modulated by lipid composition. *Biochemistry* **42**: 231-237.

Kopf, G.S. and Wilde, M.W. (1990). Signal transduction processe leading to acrosomal exocytosis in mammalian spermatozoa. *Trends in Endocrinology and Metabolism* (sept/oct): 362-367.

Labbé, C. and Loir, M. (1991). Plasma membrane of trout spermatozoa: I. Isolation and partial characterization. *Fish Physiology and Biochemistry* **9**(4): 325-338.

Labbé, C., Maisse, G., Müller, K., Zachowski, A., Kaushik, S. and Loir, M. (1995). Thermal acclimation and dietary lipids alter the composition, but not fluidity, of trout sperm plasma membrane. *Lipids* **30**(1): 23-33.

Labbé, C., Troupé, F., Saad, E.B., Rime, H.R., Kurz, A. and Müller, K. (2004). Caractérisation des rafts dans les spermatozoides de truite arc en ciel et effet de la cryoconservation du sperm sur leur structure. Dinard, Congrès GEIMM Interactions Molécules Membranes.

Ladha, S., James, P.S., Clark, D.C., Howes, E.A. and Jones, R. (1997). Lateral mobility of plasma membrane lipids in bull spermatozoa: heterogeneity between surface domains and rigidification following cell death. *The Journal of Cell Science* **110**: 1041-1050.

Lahnsteiner, F., Patzner, R.A. and Weismann, T. (1993). Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). *Reproduction, Nutrition, Development* **33**: 349-360.

- Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C. and Jahn, R. (2001). SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *The EMBO Journal* **20**: 2202-2213.
- Langlais, J. and Roberts, K.D. (1985). A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Research* **12**: 183-224.
- Mack, S.R., Everingham, J. and Zaneveld, L.J. (1986). Isolation and partial characterisation of the plasma membrane from human spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology* **240**(1): 127-136.
- Manno, S., Takakuwa, Y. and Mohandas, N. (2002). Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**(4): 1943-1948.
- Martínez, P. and Morros, A. (1996). Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Frontiers in Bioscience* **1**: 103-117.
- Maxwell, W.M. and Johnson, L.A. (1997). Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development* **46**(3): 408-418.
- Mcintyre, J.C. and Sleight, R.G. (1991). Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry. *Biochemistry* **30**: 11819-11827.
- Mengerink, K.J. and Vacquier, V.D. (2002). An ATP-binding cassette transporter is a major glycoprotein of sea urchin sperm membranes. *Journal of Biological Chemistry* **277**(43): 40729-40734.
- Morisawa, M. and Ishida, K. (1987). Short-term changes in levels of cyclic AMP, adenylate cyclase, and phosphodiesterase during the initiation of sperm motility in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* **242**: 199-204.
- Müller, K., Labbé, C. and Zachowski, A. (1994a). Phospholipid transverse asymmetry in trout spermatozoa plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **1192**: 21-26.
- Müller, K., Pomorski, T., Müller, P. and Herrmann, A. (1999). Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *The Journal of Cell Science* **112**: 11-20.
- Müller, K., Pomorski, T., Müller, P., Zachowski, A. and Herrmann, A. (1994b). Protein-dependent translocation of aminophospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Biochemistry* **33**: 9968-9974.
- Müller, P., Erlemann, K.-R., Müller, K., Calvete, J.J., Töpfer-Petersen, E., Marienfeld, K. and Herrmann, A. (1998). Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. *European Biophysical Journal* **27**: 33-41.

- Nagae, T., Yangimachi, R., Srivastava, P.N. and Yanagimachi, H. (1986). Acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertility and Sterility* **45**(5): 701-707.
- Nakano, E. (1969). Fertilization. Comparative Morphology, Biochemistry, and Immunology. In: "*Fishes*", Metz, C. B. and Monroy, A., eds., New York, London, Academic Press **2**: 295-324.
- Nikolopoulou, M., Soucek, D.A. and Vary, J.C. (1985). Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochimica et Biophysica Acta* **185**: 486-498.
- Nikolopoulou, M., Soucek, D.A. and Vary, J.C. (1986). Lipid composition of the membrane released after an in vitro acrosome reaction of epididymal boar sperm. *Lipids* **21**(9): 566-570.
- Nolan, J.P., Magargee, S.F., Posner, R.G. and Hammerstedt, R.H. (1995). Flow cytometric analysis of transmembrane phospholipid movement in bull sperm. *Biochemistry* **34**: 3907-3915.
- Ohta, K., Sato, C., Matsuda, T., Toriyama, M., Lennarz, W.J. and Kitajima, K. (1999). Isolation and characterization of low density detergent-insoluble membrane (LD-DIM) fraction from sea urchin sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **258**: 616-623.
- Ohta, K., Sato, C., Matsuda, T., Toriyama, M., Vacyuier, V.D., Lennarz, W.J. and Kitajima, K. (2000). Co-localization of receptor and transducer proteins in the glycosphingolipid-enriched, low density, detergent-insoluble membrane fraction of sea urchin sperm. *Glycoconjugate Journal* **17**(3-4): 205-214.
- Okamura, N., Tajima, Y., Soejima, A., Masuda, H. and Sugita, Y. (1985). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *The Journal of Biological Chemistry* **260**: 9699-9705.
- Parks, J.E., Arion, J.W. and Foote, R.H. (1987). Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction* **37**: 1249-1258.
- Parks, J.E. and Lynch, D.V. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* **29**: 255-266.
- Parton, R.G. (1994). Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **42**: 155-166.
- Pellicciari, C., Bottone, M.G. and Biggiogera, M. (1997). Detection of apoptotic cells by annexin V labeling at electron microscopy. *European Journal of Histochemistry* **41**: 211-216.
- Peterson, R., Russell, L., Bundman, D. and Freud, M. (1980). Evaluation of the purity of boar sperm plasma membranes by nitrogen cavitation. *Biology of Reproduction* **23**: 637-645.
- Pollard, H.B., Burns, A.L. and Rojas, E. (1988). A molecular basis for synexin-driven, calcium-dependent membran fusion. *Journal of Experimental Biology* **139**: 267-286.

Pollard, J.W., Plante, C., King, A.W., Hansen, P.J., Betteridge, K.J. and Suarez, S.S. (1991). Fertilizing capacity of bovin sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. *Biology of Reproduction* **44**: 102-107.

Pomorski, T., Herrmann, A., Zachowski, A., Deveau, P.F. and Müller, P. (1994). Rapid determination of the transbilayer distribution of NBD-phospholipids in erythrocyte membranes with dithionite. *Molecular Membrane Biology* **11**: 39-44.

Quetglas, S., Iborra, C., Sasakawa, N., De Haro, L., Kumakura, K., Sato, K., Leveque, C. and Seagar, M. (2002). Calmodulin and lipid binding to synaptobrevin regulates calcium-dependent exocytosis. *The EMBO Journal* **21**: 3970-3979.

Ramalho-Santos, J., Moreno, R.D., Sutovsky, P., Chan, A.W.-S., Hewitson, L., Wessel, G.M., Simerly, C.R. and Schatten, G. (2000). SNAREs in mammalian sperm: possible implications for fertilization. *Developmental Biology* **223**: 54-69.

Rimon, G., Bazenet, C.E., Philpott, K.L. and Rubin, L.L. (1997). Increased surface phosphatidylserine is an early marker of neuronal apoptosis. *Journal of Neuroscience Research* **48**: 563-570.

Robinson, B.S., Johnson, D.W. and Poulos, A. (1992). Novel molecular species of sphingomyelin containing 2-Hydroxylated polyenoic very-long-chain fatty acids in mammalian testes and spermatozoa. *The Journal of Biological Chemistry* **267**(3): 1746-1751.

Rothberg, K.G., Ying, Y.S., Kamen, B.A. and Anderson, R.G.W. (1990). Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *Journal of Cell Biology* **111**: 2931-2938.

Rüsse, I. and Sinowatz, F. (1998). Gametogenese. In: „*Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*“, Rüsse, I. and Sinowatz, F., eds., Berlin, Blackwell. **2**: 53-70.

Saxena, N., Petersen, R.N., Sharif, S., Saxena, N.K. and Russell, L.D. (1986a). Changes in the organization of surface antigens during in-vitro capacitation of boar spermatozoa as detected by monoclonal antibodies. *Journal of Reproduction and Fertility* **78**: 601-614.

Saxena, N., Peterson, R.N., Saxena, N.K. and Russell, L.D. (1986b). Microfilaments appear in boar spermatozoa during capacitation in vitro. *Journal of Experimental Zoology* **239**: 423-427.

Schlegel, R.A., Hammerstedt, R.H., Cofer, G.P., Kozarski, K., Freidus, D. and Williamson, P. (1986). Changes in the organization of the lipid bilayer of the plasma membrane during spermatogenesis and epididymal maturation. *Biology of Reproduction* **34**: 379-391.

Schlegel, R.A., Reed, J.A., Mcevoy, L., Algarin, L. and Williamson, P. (1987). Phospholipid asymmetry of loaded red cells. *Methods in Enzymology* **149**: 281-293.

Schlegel, R.A. and Williamson, P. (1987). Membrane phospholipid organisation as a determinant of blood cell-reticuloendothelial cell interaction. *Journal of Cell Physiology* **132**(2): 381-384.

- Schneider, R., Brugger, B., Sandhoff, R., Zellnig, G., Leber, A., Lampl, M., Athenstaedt, K., Hrastnik, C., Eder, S., Daum, G., Paltauf, F., Wieland, F.T. and Kohlwein, S.D. (1999). Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *The Journal of Cell Biology* **146**: 741-754.
- Schülke, B. (1982). Grundstruktur der Spermienzelle und Grundzüge der Biochemie des Spermas. In: „*Künstliche Besamung bei Nutztieren*“, Busch, W., Löhle, K. and Peter, W., eds., Jena, VEB Gustav Fischer Verlag: 159-184.
- Scott, A.P. and Sumpter, J.P. (1989). Seasonal variations in testicular germ cell stages and in plasma concentrations of sex steroids in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*) maturing at 2 years old. *General and comparative endocrinology* **73**: 46-58.
- Scott, T.W. (1973). Lipid metabolism of spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility suppl.* **18**: 65.
- Seaton, G.J., Hall, L. and Jones, R. (2000). Rat sperm 2B1 glycoprotein (PH20) contains a C-terminal sequence motif for attachment of a glycosyl phosphatidylinositol anchor. Effects of endoproteolytic cleavage on hyaluronidase activity. *Biology of Reproduction* **62**: 1667-1676.
- Seigneuret, M. and Devaux, P.F. (1984). ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **81**: 3751-3755.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572.
- Sims, P.J. and Wiedmer, T. (2001). Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thrombosis and Haemostasis* **86**: 266-275.
- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175** (23): 720-731.
- Somerharju, P., Virtanen, J.A. and Cheng, K.H. (1999). Lateral organisation of membrane lipids: The superlattice view. *Biochimica et Biophysica Acta* **1440**: 32-48.
- Spehr, M., Gisselmann, G., Poplawski, A., Riffell, J.A., Wetzel, C.H., Zimmer, R.K. and Hatt, H. (2003). Identification of testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science* **299**: 2054-2058.
- Spira, B. and Breitbart, H. (1992). The role of anion channels in the mechanism of acrosome reaction in bull spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta* **1109**(1): 65-73.
- Stojanoff, A., Bourne, H., Andrews, A.G. and Hyne, R.V. (1988). Phospholipid composition of isolated guinea pig sperm outer acrosomal membrane and plasma membrane during capacitation in vitro. *Gamete Research* **21**: 297-311.
- Suzuki, F. and Yanagimachi, R. (1989). Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during in vitro capacitation of golden hamster spermatozoa. *Gamete Research* **23**: 335-347.

Szöllösi, D. and Hunter, R.H.F. (1978). The nature and occurrence of the acrosome reaction in spermatozoa of the domestic pig, *Sus Scrofa*. *Journal of Anatomy* **127**(1): 33-41.

Tanaka, Y. and Schroit, A.J. (1983). Insertion of fluorescent phosphatidylserine into the plasma membrane of red blood cells, recognition by autologous macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* **258**: 11335-11343.

Tanimoto, S. and Morisawa, M. (1988). Roles for potassium and calcium channels in the initiation of sperm motility in rainbow trout. *Development, growth and differentiation* **30**: 117-124.

Tannert, A., Pohl, A., Pomorski, T. and Herrmann, A. (2003). Protein-mediated transbilayer movement of lipids in eukaryotes and prokaryotes: the relevance of ABC transporters. *International Journal of Antimicrobial Agents* **22**: 177-187.

Tesarík, J. and Fléchon, J.-E. (1986). Distribution of sterol and anionic lipids in human sperm plasma membrane: effects of in vitro capacitation. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research* **97**: 227-237.

Töpfer-Petersen, E. (1989). The sperm surface and sperm-egg interaction in the pig. In: „*Reproductiv biology and medicine*“, Holstein, A. F., Voigt, K. D. and Grässlin, D., eds., Diesbach: 78-90.

Töpfer-Petersen, E., Enßlin, M. and Waberski, D. (1996). Kapazitation: Eine kurze Übersicht. *Fertilität* **12**: 183-189.

Töpfer-Petersen, E., Schmoeckel, C. and Schill, W.B. (1983). The acrosomal membrane system of boar spermatozoa - morphological and biochemical studies. *Andrologia* **15**(1): 62-70.

Töpfer-Petersen, E. and Waberski, D. (2001). Spermienreifung und Befruchtung. In: „*Veterinärmedizinische Andrologie*“, Busch, W. and Holzmann, A., eds., Stuttgart, Schattauer: 67-82.

Toshimori, K. (1998). Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell Tissue Research* **293**: 177-187.

Travis, A.J., Merdushev, T., Vargas, L.A., Jones, B.H., Purdon, M.A., Nipper, R.W., Galatioto, J., Moss, S.B., Hunnicutt, G.R. and Kopf, G.S. (2001). Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and guinea pig spermatozoa. *Developmental Biology* **240**: 599-610.

Trevino, C.L., Serrano, C.J., Beltran, C., Felix, R. and Darszon, A. (2001). Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. *FEBS Letters* **509**(1): 119-125.

Tulsiani, D.R.P. and Abou-Haila, A. (2004). Is sperm capacitation analogous to early phase of Ca²⁺-triggered membrane fusion in somatic cells and viruses? *Bioessays* **26**(3): 281-290.

Tzima, E., Trotter, P.J., Orchard, M.A. and Walker, J.H. (1999). Annexin V binds to the actin-

based cytoskeleton at the plasma membrane of activated platelets. *Experimental Cell Research* **251**(1): 185-193.

Ujhazy, P., Ortiz, D., Misra, S., Li, S., Moseley, J., Jones, H. and Arias, I.M. (2001). Familial intrahepatic cholestasis 1: studies of localizatzion and function. *Hepatology* **34**: 768-775.

Van Helvoort, A., Schmith, A.J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A.H., Borst, P. and Van Meer, G. (1996). MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* **87**: 507-517.

Van Meer, G. (1998). Lipids of the Golgi membrane. *Trends in Cell Biology* **8**(1): 29-33.

Vincent, A.M. and Maiese, K. (1999). Direct temporal analysis of apoptosis induction in living adherent neurons. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **47**(5): 661-671.

Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Ning, X., Moore, G.D., Valenzuela, J.P., Jorgez, C.J., Alvarez, J.G. and Kopf, G.S. (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 3235-3242.

Visconti, P.E., Westbrook, V.A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S. and Diekman, A.B. (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of Reproduction Immunology* **53**: 133-150.

Wang, L., Beserra, C. and Garbers, D. L. (2004). A novel aminophospholipid transporter exclusively expressed in spermatozoa is required for membrane lipid asymmetry and normal fertilization. *Developmental Biology* **267**: 203-215.

Watala, C., Waczulikova, I., Wieclawska, B., Rozalski, M., Gresner, P., Gwozdziński, K., Mateasik, A. and Sikurova, L. (2002). Merocyanine 540 as a fluorescent probe of altered membrane phospholipid asymmetry in activated whole blood platelets. *Cytometry* **49**(3): 119-133.

Watson, P.F., Plummer, J.M. and Jones, P.S. (1992). The Ionophor-induced acrosome reaction differs structurally from the spontaneous acrosome reaction. *The Journal of Experimental Zoology* **264**: 231-235.

Wiesner, B., Weiner, J., Middendorff, R., Hagen, V., Kaupp, U.B. and Weyand, I. (1998). Cyclic nucleotide-gated channnels on the flagellum control Ca²⁺ entry into sperm. *The Journal of Cell Biology* **42**(2): 473-484.

Williamson, P., Mattocks, K. and Schlegel, R.A. (1983). Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing. *Biochimica et Biophysica Acta* **732**: 387-393.

Wolf, D.E. (1995). Lipid domains in sperm plasma membranes. *Molecular Membrane Biology* **12**: 101-104.

Wolf, D.E., Hagopian, S.S. and Ishijima, S. (1986). Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse. *The Journal of Cell Biology* **102**: 1372-1377.

- Wolfe, C.A., James, P.S., Mackie, A.R., Ladha, S. and Jones, R. (1998). Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biology of Reproduction* **59**(6): 1506-1514.
- Yagi, A. and Paranko, J. (1995). Actin, alpha-actinin, and spectrin with specific associations with the postacrosomal and acrosomal domains of bovine spermatozoa. *The Anatomical Record* **241**: 77-87.
- Yamamura, S., Handa, K. and Hakomori, S.-I. (1997). A close association of GM3 with c-Src and Rho in GM3-enriched microdomains at the B16 melanoma cell surface membrane: a preliminary note. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **236**(1): 218-222.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. In: *"The Physiology of Reproduction"*, Knoibil, E. N. J. and Neill, J. D., eds., New York, Raven Press: 189-317.
- Zachowski, A., Favre, E., Paraf, A. and Devaux, P.F. (1986). Outside-inside translocation of aminophospholipids in the human erythrocyte membrane is mediated by a specific enzyme. *Biochemistry* **25**: 2585-2590.
- Zhou, Q., Zhao, J., Wiedmer, T. and Sims, P.J. (2002). Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1. *Blood* **99**(11): 4030-4038.
- Zwaal, R.F.A., Comfurius, P. and Bevers, E.M. (1992). Platelet procoagulant activity and microvesicle formation. Its putative role in hemostasis and thrombosis. *Biochimistry et Biophysical Acta* **1180**: 1-8.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Dr. Karin Müller bedanken! Sie vermittelte mir die Grundlagen im Umgang mit Spermienzellen und begleitete mich mit wissenschaftlicher Kompetenz, persönlichem Engagement und Zuversicht durch alle Phasen dieser Promotion. Sie war für mich stets der erste Ansprechpartner bei Problemen jeglicher Art.

Herrn Prof. Dr. Andreas Herrmann danke ich für die richtungsweisende und kritische Betreuung dieser Arbeit, die den Blick auf das Wesentliche zu konzentrieren half.

Die experimentellen Arbeiten zu dieser Promotion wurden an verschiedenen Instituten durchgeführt. Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Molekulare Biophysik am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin sowie des Instituts für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V. für die herzliche Aufnahme, humorvolle Begleitung und kulinarische Bereicherung.

Herrn Dr. H. Nehring danke ich für die Möglichkeit, am IFN arbeiten zu können. Mein besonderer Dank gilt ferner Herrn Dr. B. Stähr, Frau A. Retzlaff sowie Frau K. Reguszynski für die unproblematische Beschaffung der Eberspermien und deren mikroskopische Routineuntersuchung im spermatologischen Labor des IFN.

Frau C. Labbé vom Laboratoire de Physiologie des Poissons am INRA in Rennes danke ich für die Einarbeitung in den Umgang mit Forellenspermien und die sehr effektive gemeinsame Arbeit bei der Isolierung und Charakterisierung von Membrandomänen.

Bei Frau Dagmar Viertel vom Instituts für Zoo- und Wildtierforschung möchte ich mich herzlich für die unproblematischen Kooperation und Hilfe bei den Arbeiten am Elektronenmikroskop bedanken.

Den Herren Dr. Th. Korte, L. Rothe und Dr. K.-H. Frommolt danke ich für all die unverzüglich und geduldig erteilten Hilfestellungen bei kleinen und größeren computertechnischen Problemen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und all meinen Freunden, die mich über viele Monate hinweg immer wieder unterstützten und motivierten diese Arbeit zu schreiben.

Publikationen

Kurz, A., Viertel, D., Herrmann, A. and Müller, K. (2005). Localisation of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction. *Reproduction*, eingereicht im Oktober 2004

Müller, K., Müller, P., Pincemy, G., Kurz, A. and Labbé, C (2004). Plasma membrane properties after cholesterol modification influence trout sperm fitness for cryopreservation. (in Vorbereitung)

Tannert, A., Kurz, A., Erlemann, K.-R., Müller, K., Herrmann, A., Schiller, J., Töpfer-Petersen, E., Manjunath, P., Müller, P. (2004). Characterisation of the PDC-mediated extraction of phospholipids from membranes. (in Vorbereitung)

Poster und Vorträge

Kurz, A., Müller, K., Herrmann, A. Phospholipid asymmetry in capacitated boar sperm cells. *33th Conference on Physiology and Pathology of Reproduction*, 17./18. Februar 2000, Berlin. Abstract in *Reproduction of domestic animals* **35**(1), 32, P1.15

Kurz, A., Müller, K., Labbé, C. Investigations on Triton X-100 resistant lipid clusters in trout spermatozoa – first results. *FEBS Advanced Lecture course: New developments in membrane biology: Rafts, protein sorting and signal transduction*, 28.Juni-03.Juli 2003, Tbilisi (Georgien).

Labbé, C.; F. Troupé; E. B. Saad; H. R. Rime; A. Kurz and K. Müller Caractérisation des rafts dans les spermatozoïdes de truite arc en ciel et effet de la cryoconservation du sperm sur leur structure. *Congrès GEIMM Interactions Molécules Membranes*, 21.-24. September 2004, Dinard (Frankreich).

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe verfasst zu haben und nur die angegebene Literatur verwendet zu haben.

Ich besitze keinen entsprechenden Doktorgrad und habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben.

Die dem Promotionsverfahren zugrundeliegende Promotionsordnung vom 19.06.2002 ist mir bekannt.

Anke Kurz

13. Oktober 2004